

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Modulación del estatus oxidativo y proinflamatorio en el
envejecimiento pulmonar mediante la administración de
sustancias antioxidantes**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Ángela Puig Ramos

DIRECTORES

Elena Vara Ameigeiras

Lisa Rancan

Sergio Damián Paredes Royano

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

MODULACIÓN DEL ESTATUS OXIDATIVO Y PROINFLAMATORIO EN EL
ENVEJECIMIENTO PULMONAR MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN DE SUSTANCIAS
ANTIOXIDANTES

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ángela Puig Ramos

DIRECTORES

Elena Vara Ameigeiras
Lisa Rancan
Sergio Damián Paredes Royano

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Programa de Doctorado en Investigación Biomédica

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

MODULACIÓN DEL ESTATUS OXIDATIVO Y PROINFLAMATORIO EN
EL ENVEJECIMIENTO PULMONAR MEDIANTE LA
ADMINISTRACIÓN DE SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES

Ángela Puig Ramos

Universidad Complutense de Madrid, 2020

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Programa de Doctorado en Investigación Biomédica
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



MODULACIÓN DEL ESTATUS OXIDATIVO Y PROINFLAMATORIO EN EL ENVEJECIMIENTO PULMONAR MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN DE SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES

Memoria presentada por Ángela Puig Ramos para optar al grado de Doctora en Investigación Biomédica, dirigida por las Doctoras Elena Vara Ameigeiras y Lisa Rancan, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina, y el Doctor Sergio Damián Paredes Royano, del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

Vº Bº de los directores

Elena Vara Ameigeiras

Lisa Rancan

Sergio Damián Paredes Royano

Madrid, 2020

Agradecimientos

Triste de mí, que no sé poner

El corazón en los labios.

(Rey Lear, trans. 2003, 1.1.118-9)

Merecen por supuesto un lugar en esta tesis doctoral todos aquellos sin los cuales su realización no habría sido posible. A todos aquellos que me han acompañado en este proyecto y me han otorgado su apoyo y su confianza, gracias.

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de tesis, la doctora Elena Vara, la doctora Lisa Rancan y el doctor Sergio Damián Paredes. Gracias a los tres por la confianza que habéis depositado en mí, por apoyarme desde el principio de mi trayectoria investigadora (¡allá por primero de carrera!), y por la infinita paciencia que habéis tenido conmigo. Gracias, Elena, por brindarme esta oportunidad, por contar conmigo, por vivir por y para la ciencia y la docencia, por crear una pequeña familia con su epicentro en el laboratorio de la cuarta planta y sacar adelante tantísimos proyectos. Sin ti, la labor investigadora no tendría el impacto que ha tenido en mí ni en muchísimos otros estudiantes de Medicina. Gracias, Lisa, por enseñarme las técnicas necesarias y a desenvolverme en el laboratorio, pero también por escucharme, por tu confianza, por tu pragmatismo, por tu sentido del humor, por hacer que disfrutara del tiempo en el laboratorio y, además, de tu compañía. Gracias, Sergio, por estar siempre ahí, disponible, para cualquier duda, problema e incluso tontería, por tu paciencia corrigiendo cada borrador, y por confiar en mí y tener buenas palabras a pesar de mis errores y de mis demoras.

Gracias a la doctora Sara Cuesta Sancho por haberme acompañado y enseñado en los inicios de mi trayectoria investigadora. A pesar del tiempo que ha pasado desde entonces, no me olvido de todas las tardes que he pasado contigo en el laboratorio bajo tu ala.

Gracias a la familia de “elenitas” por todos los momentos que hemos vivido juntos. Gracias a mis compañeros en el labo Adri, Cris, Celia y en particular a Alberto, con quien además he compartido las vicisitudes propias de esa especie hospitalaria con preocupaciones añadidas, el resi-doctorando.

Gracias a mis coerres, mis amigos, por haber contribuido (notablemente) a mi felicidad a lo largo de estos años.

Gracias, Alberto, mi compañero en este viaje que es la vida. Como ya sabes, sin tu manejo del Adobe Illustrator ni tu paciencia esta tesis doctoral no sería la misma. Y, desde luego, gracias por cuidarme, por hacerme reír, por despertarme a las cinco de la tarde los salientes de mater con comida a domicilio. ¿Qué puedo decir, Alberto, que no empequeñezca la realidad?

Gracias a mi familia y, en particular, a mis padres. Por vosotros soy quien soy, me habéis dado las herramientas para forjar mi felicidad. Mientras redacto estas líneas, no puedo sino sentirme como Cordelia ante el rey Lear, y esperar, como ella, que mi cariño pese más que mi lengua.

Abreviaturas

$\cdot\text{HO}_2$: radical perhidroxilo

$\cdot\text{O}_2^-$: radical superóxido

AIF: factor inductor de la apoptosis (*apoptosis inducing factor*)

BAD: promotor de muerte asociado a la familia Bcl-2 (*Bcl-2-associated death promoter*)

BAX: proteína X asociada a la familia Bcl-2 (*Bcl-2-associated X protein*)

CAT: catalasa

cGMP: guanosín monofosfato cíclico (*cyclic guanosine monophosphate*)

CO_2 : dióxido de carbono

Eo: estradiol

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica

ER: receptor de estrógeno (*estrogen receptor*)

ERK: quinasa regulada por señales extracelulares (*extracellular signal-regulated kinase*)

GPx: glutatión peroxidasa

GR: glutatión reductasa

GSH: glutatión

H_2O_2 : peróxido de hidrógeno

HEK: células renales embrionarias (*human embryogenic kidney cells*)

HO: hemooxigenasa

IFN: interferón

IL: interleuquina

IX: isoxantohumol

I κ B: inhibidor del factor de transcripción nuclear kappa B

LPO: Peroxidación lipídica (*lipoperoxides*)

Mel: melatonina

MT: receptor de membrana de melatonina

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NF κ B: factor de transcripción nuclear kappa B (*nuclear factor kappa B*)

NKAP: proteína activadora de NF κ B (*NF κ B-activating protein*)

NO: óxido nítrico (*nitric oxide*)

NO_2 : dióxido de nitrógeno

NOS: óxido nítrico sintasa (*nitric oxide synthase*)

Nrf: factor asociado al factor eritroide 2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor*)

OH^- : hidroxilo

ONOO^- : peroxinitrito

PaO_2 : presión arterial de oxígeno

PC: fosfatidilcolina (*phosphatidylcholine*)

Pho: fitoestrógenos

PN: prenilnaringenina

PPAR: receptor activado por proliferadores de peroxisomas (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*)

RNS: especies reactivas de nitrógeno (*reactive nitrogen species*)

ROO^\cdot : radical peroxilo

ROS: especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*)

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (*reverse transcription polymerase chain reaction*)

SAMP: ratones proclives al envejecimiento acelerado (*senescence-accelerated prone mice*)

SAMR: ratones resistentes al envejecimiento acelerado (*senescence-accelerated resistant mice*)

TLR: receptor de tipo Toll (*Toll-like receptor*)

TNF: factor de necrosis tumoral (*tumor necrosis factor*)

WB: Western Blot

XN: xantohumol

Índice

Agradecimientos	1
Abreviaturas	5
Resumen	13
Summary	17
1. Introducción	21
El envejecimiento	23
El pulmón y el envejecimiento pulmonar	35
Melatonina	38
Xantohumol	41
Estradiol y fitoestrógenos	43
Modelos animales utilizados	45
2. Hipótesis y objetivos	47
3. Material y métodos	51
1. Experimentos sobre pulmón en modelo animal de envejecimiento acelerado	53
Animales	53
Tratamientos	53
Determinaciones realizadas	54
Extracción de mRNA y cuantificación mediante PCR	55

Expresión de proteínas	57
Medición de marcadores de daño oxidativo del RNA	58
Análisis estadístico	59
2. Experimentos sobre neumocitos tipo II.....	60
Experimentos con administración de melatonina.....	60
Experimentos sobre modelo animal de supresión estrogénica	60
Aislamiento y cultivo de los neumocitos tipo II	62
Determinaciones realizadas.....	63
Medición de cGMP y LPO.....	63
Medición de la liberación de CO	64
Medición de la liberación de NO	64
Medición de la actividad de GR, GPx y CAT	64
Determinación de la síntesis de surfactante	65
Análisis estadístico	66
4. Resultados	67
1. Experimentos sobre pulmón en modelo animal de envejecimiento acelerado	69
1.1. Expresión de mediadores inflamatorios	69
1.2. Expresión de marcadores de estrés oxidativo.....	74
1.3. Expresión de mediadores apoptóticos	78
2. Experimentos sobre neumocitos tipo II.....	81
2.1. Resultados en machos de ratas Wistar tratados con melatonina.....	81

2.2. Resultados sobre modelo de supresión estrogénica	84
5. Discusión.....	91
6. Conclusiones.....	111
8. Bibliografía.....	115
9. Anexos	133
Artículo I	134
Artículo II	136
Congresos.....	138

Resumen

Modulación del estatus oxidativo y proinflamatorio en el envejecimiento pulmonar mediante la administración de sustancias antioxidantes

Introducción

El envejecimiento consiste en un cúmulo de cambios deletéreos que ocurren en las células y tejidos con el paso del tiempo y que conducen a una alteración de la homeostasis, predisponiendo a un mayor riesgo de desarrollo de enfermedades y de muerte.

Hoy día consideramos el estrés oxidativo, generado fundamentalmente en el metabolismo basal mitocondrial y en la inflamación, uno de los principales mecanismos causales de daño y de disfunción celular en el envejecimiento. Así, la exposición a antígenos tanto clínica como subclínica a lo largo de la vida desencadena una respuesta inflamatoria y oxidativa para el huésped capaz de amplificarse y sostenerse en el tiempo.

Por otro lado, la apoptosis constituye una línea de defensa frente al cúmulo de células disfuncionales y por tanto frente a la aparición de tumores, pero también se relaciona con la atrofia tisular propia de la senectud, requiriéndose un equilibrio entre señales pro y antiapoptóticas que promueva la funcionalidad tisular.

Además, a lo largo del envejecimiento se producen cambios en el sistema nervioso y en los ejes neurohormonales. Este es el caso de la glándula pineal, de manera que en individuos de

edad avanzada se produce un descenso en los niveles circulantes de la hormona melatonina, así como del eje gonadal, que se ve particularmente alterado en las mujeres con el climaterio.

Hipótesis y objetivos

El pulmón, al constituir una interfaz entre el medio interno y externo, está particularmente expuesto a agentes patógenos y contaminantes. Cabe esperar un incremento de los fenómenos de estrés oxidativo, inflamación y apoptosis en el tejido pulmonar con el envejecimiento, asociando una pérdida de funcionalidad. Además, estos fenómenos podrían verse agravados por la desregulación de ejes hormonales presente en el envejecimiento, entre ellos, la supresión estrogénica secundaria al climaterio, y la reducción en la producción de melatonina.

Nos planteamos por tanto investigar los mecanismos moleculares implicados en el envejecimiento pulmonar y su modulación a través de la administración de sustancias con actividad antioxidante e inmunomoduladora, melatonina y xantohumol, sobre un modelo murino de envejecimiento, así como el estatus inflamatorio y oxidativo pulmonar sobre un modelo animal de supresión estrogénica y su posible modulación con suplementación hormonal o con fitoestrógenos. Para ello se determinaron los niveles de citoquinas proinflamatorias, marcadores de estrés oxidativo y mediadores apoptóticos en pulmón de ratón, así como de marcadores de estrés oxidativo y síntesis de surfactante pulmonar en neumocitos tipo II de ratas Wistar, y se evaluaron los efectos de los tratamientos con melatonina, xantohumol, estradiol y fitoestrógenos.

Material y métodos

Se emplearon ratones macho proclives al envejecimiento acelerado (SAMP8) y resistentes a este envejecimiento (SAMR1) de 2 (jóvenes) y de 10 (viejos) meses de edad. Los ratones viejos fueron asignados al grupo control o bien recibieron tratamiento con melatonina a las dosis de 1 o de 10 mg/kg/día; o bien con xantohumol a las dosis de 1 o de 5 mg/kg/día. Se analizaron los niveles pulmonares de mediadores inflamatorios (TNF α , IL-1 β , NF κ B) y marcadores de estrés oxidativo (HO-1, HO-2, eNOS, iNOS) mediante RT-PCR (mRNA) o Western Blot (expresión proteica). En los ratones tratados con melatonina se midieron además niveles de oxidación de RNA (8-OHG, ELISA) y mediadores apoptóticos (BAD, BAX, AIF, Bcl-2, mediante RT-PCR y Western Blot).

Para el estudio de alteraciones en neumocitos tipo II se emplearon ratas Wistar macho que fueron asignadas a cuatro grupos experimentales: jóvenes control (2 meses de edad), viejos control (24 meses de edad), viejos tratados con 2,5 mg/kg/día de melatonina y viejos tratados con 5 mg/kg/día de melatonina. Se realizaron mediciones de CO (ratio de hemoglobina:carboxihemoglobina tras la adición de hemoglobina), NO (test de Griess), LPO (ELISA), cGMP (ELISA) y producción *de novo* de fosfatidilcolina (incorporación de D-[U-14C] glucosa a fosfatidilcolina). Además, para la evaluación de los efectos de la supresión estrogénica sobre el envejecimiento pulmonar se emplearon ratas macho y hembra de la cepa Wistar. Las hembras se dividieron aleatoriamente en dos grupos: ooforectomizadas y no ooforectomizadas. De ellas, las ooforectomizadas recibieron tratamiento con estradiol, con extracto de soja (fuente de fitoestrógenos) o bien con placebo. Se midieron los marcadores ya citados, además de la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, GPx y GR por espectrofotometría.

Resultados

El envejecimiento condujo a un incremento de los mediadores proinflamatorios (TNF α , IL-1 β , NF κ B2, NF κ B subunidad p50, NF κ B subunidad p65 y NKAP), marcadores de estrés oxidativo (HO-1, 8-OHG e iNOS) y mediadores proapoptóticos (BAD, BAX y AIF) en pulmón de ratón SAMP8 respecto a ratones jóvenes de su misma cepa ($p < 0,05$). Los ratones SAMR1 viejos no mostraron diferencias respecto a los jóvenes de su misma cepa y presentaron valores más bajos de dichos parámetros que los ratones SAMP8 ($p < 0,05$). La administración de melatonina y de xanthohumol consiguió revertir la mayoría de las alteraciones asociadas al envejecimiento ($p < 0,05$).

En neumocitos tipo II se observó que tanto la edad como la castración promovieron un incremento en las concentraciones de NO, cGMP, CO y LPO ($p < 0,05$), así como una disminución en la expresión de enzimas antioxidantes y en la capacidad de producción de surfactante pulmonar (fosfatidilcolina) ($p < 0,05$). Los cambios asociados a la edad fueron reversibles con la administración de melatonina ($p < 0,05$), mientras que la administración de estradiol y de extracto de soja pudo contrarrestar los efectos de la castración ($p < 0,05$).

Conclusiones

La administración de melatonina y xanthohumol podría tener efectos beneficiosos sobre las alteraciones proinflamatorias, prooxidantes y, en el caso de la melatonina, proapoptóticas inducidas por el envejecimiento pulmonar. Además, la supresión estrogénica conduce a alteraciones en el estatus redox pulmonar que pueden ser revertidas con la administración de estradiol y de fitoestrógenos derivados de la soja.

Summary

Modulation of the proinflammatory and prooxidant status in the aging lung by the administration of antioxidants

Introduction

Aging consists of a series of deleterious changes in cells and tissues along time, which lead to altered homeostasis and increase the risk of illness as well as death.

Nowadays we consider oxidative stress, mainly secondary to basal mitochondrial metabolism and to inflammation, as one of the most relevant mechanisms of cell damage and dysfunction during aging. Thus, both clinic and subclinic antigen exposure along life trigger a chronic inflammatory and oxidative response in the host, which amplifies and persists over time.

Furthermore, apoptosis is a defensive mechanism against the proliferation of dysfunctional cells and thus against tumor acquisition, but it is also involved in cell loss leading to tissue atrophy seen with age. Therefore, a balance between pro and antiapoptotic signaling promoting tissue function is required.

Moreover, aging leads to changes in the nervous system and in neurohormonal axes. This is the case of the pineal gland, with decreased circulating levels of the hormone melatonin in older individuals; as well as the gonadal axis, which is particularly altered during menopause.

Hypothesis and objectives

The lung, due to its position between the internal and the external milieu, is particularly exposed to pathogens and pollutants. An upregulation of oxidative stress, inflammation and apoptosis in lung tissue is expected, leading to decreased functionality. Moreover, these changes may be worsened by the dysregulation of neurohormonal axes during aging, among them, melatonin production downswing and oestrogen deprivation due to menopause.

Therefore, we aimed to investigate the molecular mechanisms involved in aging and their modulation by the administration of substances with antioxidant and immunomodulatory activity, such as melatonin and xanthohumol, in a murine aging model, as well as the inflammatory and oxidative status in an animal model of oestrogen deprivation and its possible modulation through hormone replacement therapy or phytoestrogen supplementation. For that purpose, we measured the levels of proinflammatory cytokines, oxidative stress markers and apoptosis parameters in mouse lungs, as well as oxidative stress markers and surfactant synthesis in Wistar rats' type II pneumocytes. The effects of the treatments with melatonin, xanthohumol, oestradiol and phytoestrogen were evaluated.

Materials and methods

Senescence-accelerated prone mice (SAMP8) and senescence-accelerated resistant mice (SAMR1) aged 2 (young) and 10 (old) months old were used. Mice were assigned to the control group or received treatment with melatonin 1 or 10 mg/kg/day; or with xanthohumol 1 or 5 mg/kg/day. The levels of inflammation mediators (TNF α , IL-1 β , NF κ B) and oxidative stress markers (HO-1, HO-2, eNOS, iNOS) were measured by means of RT-PCR (mRNA) or Western Blot analysis (protein expression). In mice treated with melatonin levels of mRNA oxidation (8-OHG,

ELISA) and apoptotic mediators (BAD, BAX, AIF, Bcl-2, by means of RT-PCR and Western Blot) were measured.

In order to study alterations in type II pneumocytes male Wistar rats were assigned to four experimental groups: young control (2 months old), old control (24 months old), old treated with 2.5 mg/kg/day melatonin and old treated with 5 mg/kg/day melatonin. Levels of CO (haemoglobin:carboxyhaemoglobin ratio after haemoglobin addition), NO (Griess reaction), LPO (ELISA), cGMP (ELISA), and *de novo* phosphatidylcholine production (incorporation of 10 mmol/L D-[U-14C] glucose into phosphatidylcholine) were measured. Furthermore, to evaluate the effects of oestrogen deprivation in the aging lung, male and female Wistar rats were used. Female rats were randomly kept intact or subjected to double oophorectomy. Oophorectomized rats received treatment with oestradiol, soy extract (as phytoestrogen source) or placebo. The oxidative stress markers mentioned above were measured, as well as the activity of the antioxidant enzymes CAT, GPx and GR by means of spectrophotometry.

Results

Aging led to an increase in proinflammatory mediators (TNF α , IL-1 β , NF κ B2, NF κ B p50 subunit, NF κ B p65 subunit and NKAP), oxidative stress markers (HO-1, 8-OHG and iNOS) and apoptosis parameters (BAD, BAX and AIF) in the lungs of SAMP8 mice when compared to young animals of the same strain ($p < 0.05$). Melatonin and xanthohumol treatments were able to reverse most of the changes linked with age ($p < 0.05$).

Type II pneumocytes showed an increase with age as well as with castration in the levels of NO, cGMP, CO and LPO ($p < 0.05$), a decrease in antioxidant enzymes, and in pulmonary surfactant synthesis (phosphatidylcholine) ($p < 0.05$). Age-associated changes were

reversed by melatonin treatment ($p < 0.05$), while oestradiol and soy extract treatments were able to reverse the effects of castration ($p < 0.05$).

Conclusions

Treatment with melatonin or xanthohumol may exert beneficial effects in the proinflammatory, prooxidant, and, in the case of melatonin, proapoptotic alterations in the aging lung. Moreover, oestrogen deprivation leads to an altered redox status in the lung which may be reversed by treatment with oestradiol or soy-derived phytoestrogens.

1. Introducción

El envejecimiento

Vivimos en una sociedad en la que las mejoras nutricionales, económicas, sanitarias y de infraestructura han ocasionado un espectacular incremento de la esperanza de vida, de manera que si un individuo nacido en la Europa de la segunda mitad del siglo XVIII podía aspirar a vivir 33,72 años, para un nacido en el 2019 la expectativa es 81,34 años (Statistics Sweden 2020). Por tanto, la creciente proporción de población anciana en la sociedad actual ha suscitado el interés de la comunidad científica en el envejecimiento, sus mecanismos y cómo evitarlo.

El envejecimiento es un fenómeno que surge simultáneamente con el origen de la vida, estimado en hace unos 3.500 millones de años (Javaux 2019). A pesar de tratarse de un concepto con el que nos sentimos familiarizados, su definición es compleja. Hoy día entendemos el envejecimiento como un cúmulo de cambios deletéreos que ocurren en las células y tejidos con el paso del tiempo y que conducen a una alteración de la homeostasis, predisponiendo a un mayor riesgo de desarrollo de enfermedades y, en última instancia, de muerte (Harman 1991; Troen 2003).

Podemos reconocer múltiples consecuencias del envejecimiento, compartidas al menos por las diversas especies de mamíferos (Troen 2003). La composición bioquímica de los tejidos sufre alteraciones a varios niveles. Ha sido ampliamente estudiada la pérdida de masa magra y ósea en los humanos con la edad, conservándose la cantidad de tejido adiposo y por tanto presentando un incremento porcentual de este último (Rossman 1986). No solo se han observado cambios cuantitativos a nivel tisular, sino también cualitativos, como la acumulación de glicación de fibras de colágeno que conduce a un incremento de la rigidez en la pared vascular (Vistoli et al. 2013). Los diversos cambios sufridos por los individuos a lo largo del tiempo les conducirían a una disminución progresiva de su capacidad fisiológica para responder de forma adaptativa tanto a estímulos ambientales como internos, con mayores dificultades para mantener la homeostasis.

Por ejemplo, se ha demostrado una correlación inversa entre la capacidad de aclaramiento mucociliar en humanos y la edad (Svartengren 2005; Proença de Oliveira-Maul et al. 2013). Así, la vulnerabilidad al desarrollo de enfermedades y por tanto la mortalidad aumentan de forma exponencial con la edad, particularmente tras haber alcanzado la madurez sexual. Este patrón de supervivencia está ampliamente extendido entre distintas especies, incluyendo también organismos unicelulares y animales invertebrados (Kaeberlein 2001).

El empeño por comprender cómo y por qué tienen lugar estos cambios asociados al paso del tiempo ha conducido al desarrollo de múltiples teorías para explicar el envejecimiento. Puesto que cada teoría explora el envejecimiento desde una perspectiva concreta, debemos contemplarlas como complementarias, ya que ninguna por sí sola consigue dar respuesta a la pregunta de por qué envejecemos.

Desde un punto de vista evolutivo, cabe destacar que las características sometidas a la selección natural son aquellas que se manifiestan en la juventud y que permiten al individuo procrear y cuidar de su descendencia hasta que esta pueda sobrevivir por sí misma. En este contexto, Kirkwood identifica tres categorías de genes involucrados en el envejecimiento: 1) aquellos que regulan el mantenimiento y la reparación de las células somáticas; 2) genes que promueven la supervivencia temprana y son transmitidos a la descendencia pero que resultan deletéreos a largo plazo (fenómeno conocido como “pleiotropía antagónica”); y 3) genes sometidos a mutaciones tardías y que por tanto no son sometidos al proceso de selección natural (Kirkwood 1996; Austad y Hoffman 2018). Esta teoría evolutiva del envejecimiento explicaría por qué se ha conservado dicho patrón de supervivencia (aumento de la morbilidad y de la mortalidad una vez alcanzada la madurez sexual) a lo largo de la evolución.

Las teorías evolutivas no obstante no arrojan luz sobre los mecanismos moleculares por los cuales ocurren cambios deletéreos en los organismos. Tradicionalmente las teorías sobre las causas del envejecimiento se han clasificado en estocásticas y en genéticas o del desarrollo.

Las teorías estocásticas atribuyen el envejecimiento a cambios ocurridos de forma aleatoria en moléculas clave; por ejemplo, mutaciones secundarias a la radiación de fondo sobre moléculas implicadas en la síntesis de DNA o sobre otras moléculas “molde” que se acumularían a lo largo del tiempo dando lugar finalmente a productos disfuncionales (Orgel 1963; Troen 2003; Ruan et al. 2018). No obstante, parece que la acumulación de proteínas alteradas en un organismo a lo largo del tiempo se debe en mayor medida a cambios postraduccionales como la oxidación o la glicación y no tanto a la síntesis errónea de proteínas (Troen 2003). En este sentido se orienta la teoría del entrecruzamiento (*cross-linkage*), que postula que la creación de enlaces cruzados entre macromoléculas (por ejemplo, de fibras de colágeno) conduce a su acumulación y potencialmente a la disfunción celular o tisular (Bjorksten 1968).

Para comprender en primer lugar por qué las biomoléculas sufren alteraciones debemos atender a la teoría de los radicales libres desarrollada por Harman en 1956. Esta teoría postula que la causa subyacente y común a los procesos de envejecimiento es la iniciación de reacciones de radicales libres, dada su capacidad de producir alteraciones moleculares aleatorias (Harman 1956). Los radicales libres son moléculas con un electrón desapareado en su orbital más externo, de manera que tienden a combinar dicho electrón con otras moléculas alterando su estructura en un proceso conocido como oxidación, por lo que hablamos de estrés oxidativo (Fridovich 1978). Según esta teoría, los cambios deletéreos asociados al envejecimiento serían consecuencia de la acumulación de moléculas que han perdido su estructura original y por tanto su funcionalidad como resultado de su interacción con radicales libres.

Las reacciones de los radicales libres se caracterizan por tres fases: 1) iniciación; 2) propagación y 3) terminación. Durante la propagación es posible la generación de una reacción en cadena, de manera que un solo radical libre puede generar daño sobre un gran número de moléculas (Harman 2006). Las principales fuentes de radicales libres en los mamíferos son la cadena respiratoria mitocondrial, la fagocitosis, la síntesis de prostaglandinas, el citocromo P450, reacciones no enzimáticas de oxígeno y las radiaciones ionizantes. Puesto que la principal fuente de radicales libres en la célula es la reducción del oxígeno para la producción de ATP durante la fosforilación oxidativa mitocondrial, la mayoría son especies reactivas de oxígeno, comúnmente denominadas ROS (por sus siglas en inglés, *reactive oxygen species*). Son ejemplos de especies reactivas de oxígeno el radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^{\cdot} , el más reactivo conocido), el perhidroxilo (HO_2^{\cdot}) o el peroxilo (ROO^{\cdot}), entre otros, todos ellos con capacidad de combinarse con diversas macromoléculas (proteínas, DNA, lípidos...) alterando su función.

Por otro lado, la oxidación del óxido nítrico (NO), molécula endógena involucrada en numerosos procesos fisiológicos, conduce a la formación de especies reactivas de nitrógeno (RNS, del inglés *reactive nitrogen species*). El NO es producido por la enzima NO sintasa, que presenta varias isoformas, entre ellas una constitutiva expresada en el endotelio, eNOS, implicada en la regulación del tono vascular; y otra inducible, iNOS, fundamentalmente expresada en macrófagos e implicada en procesos inflamatorios. La sobreproducción de NO en un entorno oxidativo da lugar a la formación de radicales de nitrógeno como el peroxinitrito (ONOO^{\cdot}) y el dióxido de nitrógeno (NO_2), ambos capaces de alterar la estructura y función de macromoléculas constituyentes de la célula (Beckman y Koppenol 1996).

Así, se han descrito varias alteraciones moleculares debidas a su oxidación a cargo de radicales libres. Entre las modificaciones sufridas por las proteínas encontramos la nitrosación de

residuos de tirosina, la carboxilación de residuos de lisina, arginina, treonina o prolina, la sulfoxidación de metioninas o la tiolación de cisteínas. Todas estas alteraciones conducen a cambios conformacionales que no solo impiden la correcta función proteica, sino que además dificultan su adecuada degradación a cargo del proteasoma, por lo que acaban acumulándose en la célula (Cannizzo et al. 2011). La peroxidación lipídica (LPO) también ocasiona graves daños estructurales y funcionales para la célula, de manera que los lípidos de membrana poliinsaturados sometidos a procesos de oxidación conducen a una reducción en la fluidez de la bicapa lipídica (Cannizzo et al. 2011; Vistoli et al. 2013).

Como ya se ha indicado, la principal fuente endógena de radicales libres es el metabolismo oxidativo. En la membrana interna mitocondrial, la enzima citocromo c oxidasa ejecuta la reducción de oxígeno molecular a agua gracias a cuatro electrones. No obstante, a lo largo de la cadena de transporte electrónico algunos electrones escapan a esta ruta de manera que tiene lugar la reducción del oxígeno molecular con un único electrón al radical superóxido (Starkov 2008), lo que convierte a la mitocondria en una fuente de ROS. De hecho, el propio Harman asocia el proceso del envejecimiento al estrés oxidativo sufrido por la mitocondria, asignándole el papel de reloj biológico (Harman 1972). La producción de ROS es proporcional a la actividad de la cadena de transporte electrónico, lo cual nos conduce a estipular que una reducción en la ingesta conllevaría una reducción en la generación de ROS (Harman 2006). En efecto, la restricción calórica se ha demostrado efectiva como estrategia antienviejecimiento, de manera que ratas sometidas a una reducción de la ingesta del 40% vieron incrementada su longevidad en un 49% (Yu et al. 1982). No obstante, la respuesta a la restricción calórica parece ser especie-dependiente, habiéndose observado diferentes patrones con resultados menos espectaculares en monos (Kayo et al. 2001).

Los organismos presentan varios mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo y a los daños producidos por él. La mayoría de las células disponen de antioxidantes enzimáticos: superóxido dismutasa (SOD), presente en el citosol (Cu-SOD y Zn-SOD) y en las mitocondrias (Cu, Zn y Mn-SOD) y que convierte los radicales hidroxilo en peróxido de hidrógeno; catalasa (CAT), presente en los peroxisomas y en los eritrocitos y que metaboliza el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular; y el sistema glutatión peroxidasa (GPx) y reductasa (GR), que gracias a la oxidación del glutatión (GSH) a glutatión disulfuro (GSSG) permite la eliminación del peróxido de hidrógeno y la conversión de hidroperóxidos de lípidos a sus correspondientes alcoholes (Meister y Anderson 1983; Bannister et al. 1987; Zámocký y Koller 1999). Además, existen varios antioxidantes no enzimáticos capaces de actuar como barredores de radicales libres, como la melatonina, los flavonoides, el ácido ascórbico, la biliverdina y su metabolito bilirrubina. La biliverdina y bilirrubina proceden del catabolismo del grupo hemo (Fe-protoporfirina IX), citotóxico en su estado libre, a cargo de la enzima hemooxigenasa (HO) (Araujo et al. 2012). En esta reacción (en presencia de NADPH, tres moléculas de oxígeno molecular y la reductasa citocromo P450) se obtienen como producto cantidades equimolares de biliverdina, monóxido de carbono (CO) e ion ferroso (Fe^{2+}). La HO presenta fundamentalmente dos isoformas: la HO-2, constitutiva, y la HO-1, inducible. La HO-1 se expresa de forma basal en concentraciones bajas en numerosos tejidos constituyendo un mecanismo de protección frente a radicales libres. Sus concentraciones se ven aumentadas de manera temprana como respuesta a situaciones de inflamación, hipoxia, isquemia o hipertermia, por lo que constituye un marcador de estrés celular particularmente sensible (Maines 1997).

Además del metabolismo oxidativo basal, una fuente fundamental de ROS es el denominado *estallido oxidativo* generado por el sistema inmune como línea de defensa frente a organismos patógenos. Neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y monocitos liberan ROS con gran capacidad microbicida (fundamentalmente radicales peróxido, hidroxilo, peroxinitrito e

hipoclorito) como parte de la respuesta inflamatoria. No obstante, los tejidos circundantes sufren también los efectos de este estallido oxidativo (Cannizzo et al. 2011). Esta relación entre inflamación y estrés oxidativo ha conducido al desarrollo de la teoría inflamatoria del envejecimiento (Chung et al. 2006) y al concepto de *inflammaging* (Franceschi et al. 2000). Según este concepto, a lo largo de los años sufrimos una continua exposición a antígenos tanto clínica como subclínica que desencadena una respuesta inflamatoria y oxidativa dañina para el huésped capaz de amplificarse y sostenerse en el tiempo, caracterizada por un aumento en los niveles circulantes de las principales citoquinas proinflamatorias: el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interleuquina-1 (IL-1) e interleuquina-6 (IL-6). Hoy día sabemos que numerosas patologías relacionadas con el envejecimiento presentan un claro componente inflamatorio, como es el caso de la hipertensión arterial (Peeters et al. 2001), la enfermedad de Alzheimer, la aterosclerosis, la osteoporosis o la sarcopenia (Baylis et al. 2013).

Al margen de ser producidas durante el proceso de inflamación, las ROS también son capaces de inducir a su vez la liberación de citoquinas y por tanto de estimular la respuesta inflamatoria (Cannizzo et al. 2011; Baylis et al. 2013). La familia de factores de transcripción nuclear NF κ B (*nuclear factor kappa B*) constituyen mediadores inflamatorios y apoptóticos sensibles a un gran número de estímulos, desde antígenos bacterianos hasta la radiación ultravioleta. Entre los principales activadores de este factor de transcripción encontramos, además de las citoquinas proinflamatorias TNF α e IL-1, las ROS y la LPO (Bowie y O'Neill 2000). Las subunidades de NF κ B (p50, p65 o p52, entre otras) se encuentran en el citoplasma en células no estimuladas en forma de dímero unidas a una subunidad inhibidora, I κ B (como I κ B α). Las vías de activación son complejas y específicas para cada dímero formado por las distintas subunidades, así como para cada tipo celular. Por ejemplo, la subunidad p105 puede unirse a la p65 inactivándola, pero también puede ser fosforilada por TPL-2 (*tumor progression locus 2 kinase*) para ser procesada a p50, forma activa (Bowie y O'Neill 2000; Savinova et al. 2009). Una

vez activado, el NFκB es traslocado al núcleo celular donde promoverá la transcripción de genes implicados en la respuesta inflamatoria, como IL-1 (Goto et al. 1999), la ciclooxigenasa 2 (COX-2), la iNOS (Taylor et al. 1998), IL-6 o TNFα, así como de genes que codifican IκBs que establecerán un *feedback* negativo. Se ha descrito una mayor actividad del NFκB en diversos tejidos con la edad (Helenius 1996; Adler et al. 2007), apuntando a un estatus proinflamatorio adquirido con el envejecimiento.

Al involucrar al sistema inmunitario, hasta cierto punto codificado genéticamente, la teoría inflamatoria tiende un puente entre las teorías estocásticas y las genéticas o del desarrollo. Estas teorías atribuyen el envejecimiento al proceso continuo de maduración y desarrollo del individuo controlado y programado a través del DNA. Así, en el envejecimiento se observa un fenómeno de inmunosenescencia, consecuencia de la complejidad del sistema inmunitario y de las influencias tanto genéticas como ambientales que sobre él actúan. Se ha demostrado una reducción en la producción de radical superóxido y de la fagocitosis con la edad, de manera que los individuos de edad avanzada presentan una peor respuesta inmunitaria innata y por tanto mayor susceptibilidad para el desarrollo de infecciones. Se han observado alteraciones también en la inmunidad adaptativa, con una involución del timo y una respuesta reducida a la carga antigénica debida a la disminución del ratio de células *naïve*: células maduras tanto B como T (Cannizzo et al. 2011; Baylis et al. 2013). Por tanto, la inmunosenescencia es simultáneamente un estado proinflamatorio pero también de inmunodepresión. Además, la propia oxidación de macromoléculas estructurales puede conducir a la formación de autoantígenos, moléculas propias reconocidas por el sistema inmune como ajenas y que por tanto van a ser diana para su eliminación (Cannizzo et al. 2011).

Dentro de esta categoría genética y del desarrollo enmarcamos también la teoría neuroendocrina del envejecimiento, según la cual los cambios degenerativos del sistema nervioso

y consecuentemente de las hormonas secretadas juegan un papel central en el envejecimiento. El climaterio constituye un factor clave en el envejecimiento y en la predisposición a enfermar en las mujeres. Así, las mujeres sometidas a ooforectomía en edad temprana presentan un mayor riesgo de desarrollar enfermedades pulmonares obstructivas (Rocca et al. 2016). Se han identificado, por otro lado, alteraciones en ejes neuroendocrinos que sugieren o bien una mayor sensibilidad a las hormonas periféricas o bien una expresión inapropiadamente baja de hormonas tróficas en individuos de edad avanzada. Estas alteraciones podrían ser tanto causa como consecuencia del envejecimiento, al verse afectados los ejes neuroendocrinos por mecanismos moleculares ya descritos (Troen 2003).

El propio ciclo celular presenta implicaciones para su envejecimiento. Durante cada replicación celular, se ha observado un acortamiento de los telómeros, estructuras localizadas en el final de los cromosomas y que previenen su fusión entre ellos (Harley et al. 1990; Troen 2003), lo cual podría limitar el número de divisiones celulares posibles. Se estipula, por tanto, que la longitud de los telómeros y la actividad de la telomerasa podrían estar implicadas en el proceso de envejecimiento.

La célula está dotada de la información necesaria para su propia destrucción. La apoptosis constituye una forma de *suicidio* celular programado por la propia célula y que conduce a una delección controlada de sí misma (Kerr et al. 1972). La apoptosis implica una compactación y segregación de la cromatina, un plegamiento de la membrana celular con formación de vesículas y la fragmentación celular, conduciendo a su degradación lisosomal. Se trata de un fenómeno fundamental para el mantenimiento de la homeostasis, ya que controla las distintas poblaciones celulares. Durante el desarrollo embrionario la apoptosis permite la desaparición de varias células y su reemplazo por otras para la organogénesis. Gracias a la apoptosis, las células que han ido acumulando daño y ya no pueden ejercer correctamente su función son eliminadas sin

desencadenar una respuesta inflamatoria. Parece ser que esta capacidad se reduce con la edad (Suh et al. 2002). Uno de los mecanismos por los cuales se estipula que la restricción calórica puede incrementar la vida de un individuo es el aumento de la apoptosis, consiguiéndose la eliminación de células preneoplásicas (Troen 2003). No obstante, la apoptosis es un fenómeno implicado en varias enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer o de Parkinson, así como en la atrofia tisular observada en el envejecimiento (osteopenia, sarcopenia, capacidad de cicatrización reducida...).

Por lo tanto, se requiere un equilibrio entre señales proapoptóticas, que prevendrían la formación de tumores y por tanto tienen el potencial de aumentar la esperanza de vida, y antiapoptóticas, que prevendrían el deterioro de varios tejidos asociado al envejecimiento. Las señales implicadas en los procesos apoptóticos y antiapoptóticos son complejas. Entre los mecanismos moleculares relacionados con la regulación de la apoptosis encontramos la familia Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*), encargada de controlar la homeostasis mitocondrial. En esta familia encontramos moléculas tanto inductoras de la apoptosis (BAD, BAX, BAK, Bcl-xS...) como inhibidoras (Bcl-2, Bcl-xL...). Tras una señal de estrés, las moléculas proapoptóticas se disponen alrededor de la membrana mitocondrial, donde se encuentran de manera constitutiva las antiapoptóticas. Se produce entonces una heterodimerización y traslocación a la membrana mitocondrial, incrementando su permeabilidad y provocando la salida del citocromo c (habitualmente implicado en la fosforilación oxidativa) al citoplasma. En el citoplasma se une a otras moléculas proapoptóticas, activando la cascada de las caspasas. Las caspasas son cisteín-proteasas aspartato-específicas que actúan como activadoras de la apoptosis o bien como efectoras directas. Para evitar su acción indiscriminada, son sintetizadas como zimógenos, moléculas precursoras que deben ser procesadas para adquirir acción enzimática. Esta vía de activación de la apoptosis se conoce como mitocondrial o intrínseca, pero existen otras. La conocida como vía de los *receptores de muerte* o extrínseca se caracteriza por una activación de

las caspasas secundaria a una serie de mensajeros intracelulares desencadenados por la activación de receptores celulares, como es el caso de la unión del TNF α a los receptores TNFR o bien de la molécula Fas a su ligando CD95.

Las caspasas no son las únicas efectoras de la apoptosis. La vía de la granzima B es la empleada por las células NK y los linfocitos T CD8, además de la vía de Fas/Fas-L. La activación de esta vía conduce a la inserción de perforinas en la membrana celular que permiten la entrada de la granzima B, una serín-proteasa similar a las caspasas que conduce a la fragmentación del DNA y activa a la caspasa 3 en el citosol. Un papel particularmente interesante lo ejerce el factor inductor de la apoptosis AIF (del inglés *apoptosis-inducing factor*). Cuando se altera la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa, el AIF es liberado al citosol y posteriormente traslocado al núcleo, donde inducirá la condensación de la cromatina y la degradación del DNA (Joza et al. 2001). Se ha observado que el AIF no es un inductor universal de la apoptosis, pues su acción parece depender tanto del tipo celular como del estímulo proapoptótico. Así, el AIF está implicado en la apoptosis neuronal relacionada con la excitotoxicidad por glutamato, la lesión por isquemia-reperfusión o la hipoglucemia (Hangen et al. 2010). Curiosamente, además de ser un efector de la apoptosis, el AIF juega un papel crucial en el correcto funcionamiento de la fosforilación oxidativa: la ausencia de AIF en varias especies conduce a la inhibición de la expresión de varias subunidades proteicas pertenecientes a los complejos respiratorios I, III y IV (Vahsen et al. 2004; Hangen et al. 2015), habiéndose observado un metabolismo dependiente de la glicólisis en ratones deficientes en AIF (Hangen et al. 2010; Rao et al. 2019). Se han identificado niveles aumentados de AIF en patologías relacionadas con el envejecimiento, como la sarcopenia (Baker y Hepple 2006) o la enfermedad de Alzheimer (Yu et al. 2014), tanto a nivel mitocondrial como citosólico.

El envejecimiento es por tanto un fenómeno complejo y multifactorial, en el que varios mecanismos moleculares a lo largo del tiempo se ven involucrados en los cambios deletéreos sufridos por los tejidos. Hoy día consideramos el estrés oxidativo relacionado con el metabolismo mitocondrial y con la respuesta inflamatoria uno de los pilares fundamentales de los mecanismos causales del envejecimiento, siendo responsable directo de las alteraciones moleculares que conducen a la disfunción celular. La apoptosis constituye una línea de defensa frente al cúmulo de células disfuncionales y por tanto frente a la aparición de tumores, pero también se relaciona con la atrofia tisular propia de la senectud. La modulación de los fenómenos de estrés oxidativo, inflamación y apoptosis podría contribuir a frenar el proceso de envejecimiento.

El pulmón y el envejecimiento pulmonar

Los pulmones son los órganos vitales de la respiración. En ellos se produce el intercambio gaseoso que permite que la sangre desoxigenada y rica en dióxido de carbono procedente del ventrículo derecho recupere la composición adecuada para mantener el metabolismo oxidativo y el equilibrio ácido-base. El aire alcanza la interfaz gas-sangre gracias a su paso a través de zonas destinadas a la conducción de aire, los bronquios y bronquiolos, para finalmente llegar a los alveolos, estructuras saculares de unas 200 μm de diámetro tapizadas por un delgado epitelio especializado, los neumocitos tipo I, situados en contacto con los capilares de la vasculatura pulmonar. El aire está por tanto separado de la sangre por tres capas: la célula endotelial capilar, una lámina basal y el epitelio pulmonar.

El transporte de aire desde y hacia los alveolos requiere una mecánica respiratoria que genere un gradiente de presiones entre la atmósfera y las unidades alveolares. Para ello es fundamental la arquitectura pulmonar. Los bronquiolos y alveolos se encuentran soportados por una red de fibras de colágeno y de elastina que permiten su expansión y su retracción. La correcta composición de esta red evita tanto la rotura como el colapso alveolar. Para prevenir este último, es esencial la presencia de surfactante alveolar, sintetizado por los neumocitos tipo II localizados en los alveolos y constituido en un 80% por fosfolípidos (la mayor parte dipalmitoilfosfatidilcolina) así como proteínas y colesterol. Al reducir la tensión superficial dentro del alveolo, el surfactante evita el colapso de las unidades alveolares más pequeñas, que de lo contrario se vaciarían hacia las más grandes como consecuencia de la ley de Laplace (el gradiente de presiones es inversamente proporcional a la segunda potencia del radio), y se colapsarían, reduciendo finalmente la superficie de intercambio pulmonar.

El envejecimiento se asocia a cambios degenerativos en la arquitectura pulmonar y en la mecánica respiratoria. Así, alteraciones en la caja torácica condicionan una disminución del flujo

espiratorio y de la capacidad vital a medida que aumenta la cifosis fisiológica con la edad y disminuyen el espacio intercostal y la fuerza muscular (Kovacs et al. 2013). Dentro del parénquima pulmonar se han observado alteraciones en la relación ventilación/perfusión, de manera que en individuos de edad avanzada existen defectos de ventilación en la periferia pulmonar y en zonas declives, además de una disminución de la capacidad de difusión de dióxido de carbono (Skloot 2017). Este fenómeno acarrea dos consecuencias. En primer lugar, los individuos de mayor edad presentan menores presiones arteriales de oxígeno (PaO_2) y necesitan aumentar su frecuencia respiratoria para conseguir cifras similares a individuos jóvenes, sin verse alterado significativamente el contenido sanguíneo en CO_2 . En segundo lugar, el *mismatch* entre ventilación y perfusión, junto a una mayor rigidez de la vasculatura pulmonar, conduce a incrementos en la tensión pulmonar sistólica (Sicard et al. 2018). Esto no implica que los individuos de mayor edad sufran de hipertensión pulmonar, pero sí son más proclives a padecerla en caso de desarrollar otras enfermedades pulmonares.

Por otro lado, el papel del surfactante en el envejecimiento pulmonar no está dilucidado. Varios estudios no encuentran diferencias en la cantidad de surfactante hallada en individuos jóvenes o viejos (Rebello et al. 1996; Veldhuizen et al. 2019), mientras que otros sí detectan menores concentraciones de surfactante (Christmann et al. 2009) así como alteraciones en los neumocitos de tipo II (Walski et al. 2009). Por tanto, en el momento actual no podemos concluir que su producción se vea alterada como consecuencia del envejecimiento ni que los cambios degenerativos del pulmón se vean afectados por defectos en su síntesis.

Algunas de las alteraciones histopatológicas asociadas al envejecimiento pulmonar ocurren también en enfermedades pulmonares. Así, la pérdida de retracción elástica se observa también en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y en el asma, y el aumento del tamaño alveolar, en el enfisema (Skloot 2017). Existe por tanto un continuo entre envejecimiento

fisiológico y enfermedad, a veces difícil de distinguir, hasta el punto de que la EPOC ha llegado a considerarse un “fenotipo de envejecimiento pulmonar acelerado” (Sharma et al. 2009), con una dilatación de la vía aérea secundaria a la pérdida de tejido de soporte.

La posición del pulmón como interfaz entre el aire atmosférico y el torrente sanguíneo hace que se vea particularmente expuesto a agresiones externas, desde patógenos aéreos hasta contaminantes. Por tanto, toman especial relevancia para explicar su envejecimiento los fenómenos de estrés oxidativo, *inflammaging* e inmunosenescencia. Se han observado defectos en la inmunidad innata, con un incremento en el número de neutrófilos disfuncionales, así como una disminución en los receptores de tipo *toll* (TLR) y en sus mensajeros secundarios, junto a un incremento en los niveles de citoquinas proinflamatorias. En cuanto a la inmunidad adaptativa, se han identificado alteraciones como defectos en la migración de células dendríticas, reducción de la síntesis de anticuerpos y un aumento del ratio de células T de memoria: células T *naïve* (Kovacs et al. 2013). Todos estos cambios aumentan la susceptibilidad pulmonar frente al desarrollo de infecciones, y al mismo tiempo favorecen la distorsión de su arquitectura, que como hemos visto es fundamental para su correcta función.

El proceso de envejecimiento altera por tanto profundamente la fisiología pulmonar, ya que afecta directamente a varios elementos estructurales del pulmón cuya integridad es esencial para su correcta función. El conocimiento de los mecanismos del envejecimiento pulmonar nos puede conducir al desarrollo de métodos para su modulación.

Melatonina

La melatonina es una molécula altamente conservada en la filogenia a la que se atribuyen múltiples funciones desde que se describiera su efecto agregante de la melanina en los melanocitos de los anfibios (Lerner et al. 1958). Derivada del triptófano y la serotonina, es sintetizada por bacterias, protozoos, algas, plantas, invertebrados y vertebrados (Hardeland 2008), y algunas de sus funciones pueden diferir según especies y tipos celulares. Se trata de una molécula muy liposoluble, con una semivida de 20-40 min, transportada en plasma unida a albúmina en un 70%. Es metabolizada en hepatocitos mediante oxidación por el citocromo P450 CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1 y después conjugada con sulfato para ser excretada en la orina (Reiter et al. 2010). Presenta una baja biodisponibilidad oral (estimada en un 3-15%) como consecuencia de un primer paso hepático (Andersen et al. 2016; Agencia española de medicamentos y productos sanitarios 2018).

Se han identificado dos receptores de membrana para la melatonina, el MT1, localizado principalmente en sistema nervioso central, vasos sanguíneos y sistema inmune, y el MT2, en retina y cerebro, ambos acoplados a proteínas G inhibidoras. Además, la melatonina es capaz de unirse a receptores nucleares de tipo calmodulina, calreticulina y proteína-quinasa C (PKC). No obstante, ejerce también funciones independientes de receptor, pues la melatonina presenta de forma intrínseca actividad antioxidante, funcionando como un potente barredor de radicales libres tanto de oxígeno como de nitrógeno (Tan et al. 2002).

Una de las primeras funciones de la melatonina identificadas es su papel como reloj biológico, participando en los ciclos de reproducción de varias especies y regulando el ritmo sueño-vigilia. En mamíferos, el principal productor de melatonina y del cual dependen las concentraciones plasmáticas es la glándula pineal, según la información que recibe del núcleo supraquiasmático. Se ha identificado la luz azul, en torno a 470 nm, como inhibidor de la síntesis

de melatonina. Como regla general podemos afirmar que la producción de melatonina en mamíferos tiene lugar en la oscuridad, pero sus efectos varían de especie a especie, encontrándose un mismo patrón de secreción tanto en animales diurnos como nocturnos (Tan et al. 2010). No obstante, se cree que podría ser sintetizada en las mitocondrias de prácticamente todos los tipos celulares, independientemente de la exposición a la luz (Majidinia et al. 2018)

La melatonina presenta un papel en el proceso de envejecimiento mediante múltiples mecanismos. Uno de ellos es su implicación como regulador del ritmo circadiano. Los individuos ancianos presentan un patrón irregular de sueño-vigilia, con un sueño nocturno fragmentado y mayor somnolencia diurna. Estos hallazgos coinciden con los de una disminución del pico nocturno de melatonina plasmática. Esta reducción en la síntesis de melatonina podría ser secundaria al propio deterioro del núcleo supraquiasmático relacionado con el envejecimiento y la exposición a estrés oxidativo (Majidinia et al. 2018). La disrupción del ritmo sueño-vigilia se ha asociado al desarrollo de neoplasias y al envejecimiento prematuro, así como a perturbaciones en la regulación del sistema inmune.

Además de su papel como reloj biológico, la melatonina ejerce un papel como modulador inflamatorio. Se ha identificado actividad proinflamatoria y proapoptótica *in vitro* en monocitos y en células tumorales tratados con melatonina (Hardeland 2018). No obstante, la mayoría de los estudios *in vivo* le atribuyen un efecto antiinflamatorio y antiapoptótico, suprimiendo una respuesta inflamatoria sistémica secundaria a la sepsis (Paskaloğlu et al. 2004; Şener et al. 2004; Zhang et al. 2013), así como secundaria a isquemia, tanto local, vista en estudios de isquemia cerebral en ratas (Paredes et al. 2015; Rancan et al. 2018), como en órganos remotos, atenuando el daño pulmonar en un modelo de isquemia-reperfusión en ratas (Takhtfooladi et al. 2015). También ha demostrado efectos antioxidantes en otros escenarios de inflamación crónica, asociados al envejecimiento (Hardeland 2018; Majidinia et al. 2018). En modelos animales se ha

descrito una reducción en los niveles plasmáticos de melatonina con el desarrollo del síndrome metabólico, habiéndose conseguido una reversión de la hiperinsulinemia, resistencia a la insulina, hiperglucemia e hipertensión en ratas sanas y diabéticas (Leibowitz et al. 2008).

Ante los potenciales efectos beneficiosos relacionados con el control del ritmo circadiano, su acción antioxidante y su papel como modulador de la inflamación, la melatonina se postula como un tratamiento eficaz frente a los eventos adversos del envejecimiento que merece ser estudiado en profundidad.

Xantohumol

El xantohumol es una chalcona prenilada hallada en las flores hembra del lúpulo (*Humulus lupulus* L.). Esta molécula ha recibido la atención de la comunidad científica desde que a finales de los 90 se describiera su actividad antioxidante y antitumoral (Gerhauser et al. 2002). Desde entonces varios estudios han descrito diferentes actividades biológicas del xantohumol y algunos de sus metabolitos.

El xantohumol presenta una baja biodisponibilidad oral, habiéndose descrito su acumulación en el citoplasma de células intestinales Caco-2 (Liu et al. 2015) y pudiendo verse por ello retardada su absorción. Presenta una curva de absorción bifásica, con picos plasmáticos a las 2 h y a las 8 h de su administración oral, probablemente debido a un fenómeno de recirculación enterohepática. El xantohumol y su isómero isoxantohumol (IX) son parcialmente metabolizados por la microbiota intestinal y por el citocromo P450 en el hígado (principalmente CYP1A2) a desmetilxantohumol y a los fitoestrógenos 8-prenilnaringenina (8PN) y 6-prenilnaringenina (6PN). Se postula por tanto que muchos de sus efectos están mediados por estos metabolitos.

Las acciones biológicas del xantohumol descritas hasta hoy son numerosas. Así, varios estudios avalan un efecto antioxidante, habiéndose descrito una inhibición de la LPO en lipoproteínas de baja densidad inducida por sulfato de cobre (Miranda et al. 2000) y por peroxinitrito (Stevens et al. 2003). Presenta además propiedades antiinflamatorias a través de varias vías: el xantohumol ha demostrado inhibir la expresión de iNOS inducida por LPS y por IFN γ reduciendo por tanto la síntesis de NO en macrófagos de ratón RAW 264.7 (Zhao et al. 2003); ha sido también capaz de disminuir la activación de NF κ B en macrófagos activados con LPS (Cho et al. 2008) y de TNF α (Peluso et al. 2010). No solo se ha descrito actividad antiinflamatoria en el contexto de la inflamación aguda, sino que además otras investigaciones de nuestro grupo sobre

envejecimiento han hallado una inhibición en los niveles de citoquinas proinflamatorias en tejidos cardíaco (Campillo et al. 2018) y hepático (Fernández-García et al. 2019).

El xantohumol podría resultar así mismo una herramienta terapéutica frente al síndrome metabólico y trastornos asociados. Ha demostrado inhibir la diferenciación de preadipocitos al disminuir la expresión del principal marcador para los adipocitos, el PPAR γ , inducir la apoptosis de adipocitos maduros a través de la vía mitocondrial, y reducir la síntesis de ácidos grasos a través de la inhibición de la acetil transferasa; siendo capaz además de inducir desacoplamiento en la cadena de transporte electrónico mitocondrial atenuando el síndrome metabólico (Botta et al. 2005; Liu et al. 2015).

Esta chalcona ha sido además estudiada por sus acciones anticancerígenas (Gerhauser et al. 2002). Varios de sus efectos biológicos podrían relacionarse con una actividad inhibidora de la iniciación tumoral, al presentar propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. Además, al inhibir la actividad de los citocromos P450 y estimular la de enzimas de fase II podría reducir la activación de metabolitos cancerígenos y promover su detoxificación (Strathmann y Gerhauser 2012). Por otro lado, se ha identificado al xantohumol como un inductor de la apoptosis tanto por la vía extrínseca como por la mitocondrial (Pan et al. 2005; Colgate et al. 2007; Strathmann et al. 2010), presentando por tanto una potencial actividad preventiva y terapéutica frente al desarrollo de neoplasias.

La multitud de acciones biológicas descritas acerca del xantohumol suscitan un particular interés en sus efectos *in vivo* a medio y largo plazo. Su implicación en los fenómenos de estrés oxidativo, inflamación y apoptosis lo convierten en una molécula con gran potencial como parte del arsenal terapéutico frente al proceso de envejecimiento pulmonar, por lo que será objeto de estudio de esta tesis doctoral.

Estradiol y fitoestrógenos

Las enfermedades respiratorias crónicas suponen una de las principales causas de morbilidad a lo largo de la vida de los seres humanos. Aunque presenten diferentes fisiopatologías, los datos epidemiológicos sugieren que las hormonas sexuales podrían estar implicadas en la patogenia o progresión de varias enfermedades pulmonares (Badesch et al. 2010; Choi 2011; Leynaert et al. 2012). Por ejemplo, la fibrosis pulmonar idiopática se ha considerado tradicionalmente una enfermedad masculina en términos de prevalencia (Townsend et al. 2012). No obstante, la mortalidad aumenta de manera más pronunciada en mujeres, y modelos animales muestran una mayor predisposición a la fibrosis pulmonar en hembras (Moore y Hogaboam 2008; Brass et al. 2010; Raghu et al. 2014). Por otro lado, las mujeres asmáticas experimentan un empeoramiento de los síntomas con la caída de los niveles de estrógenos (Townsend et al. 2012). Las mujeres sometidas a ooforectomía antes de los 46 años presentan un mayor riesgo de desarrollar asma y EPOC (Rocca et al. 2016), y las mujeres fumadoras tras el climaterio muestran un deterioro más acelerado en la función pulmonar y mayor riesgo de desarrollo de EPOC que los hombres fumadores, habiéndose identificado una reducción en la hiperreactividad bronquial gracias a la terapia hormonal sustitutiva en mujeres postmenopáusicas (Gan et al. 2006). La actividad estrogénica parece estar implicada además en el proceso de envejecimiento pulmonar. Se ha identificado el desarrollo de un fenotipo pulmonar enfisematoso en hembras de ratón con déficit estrogénico, mientras que la administración de estradiol se ha mostrado capaz de restaurar la integridad de la matriz extracelular pulmonar (Glassberg et al. 2014).

Todos estos datos sugieren la posibilidad de que las mujeres sean particularmente vulnerables al envejecimiento pulmonar con la caída de los niveles de estrógenos al alcanzar el climaterio. Aunque varios estudios han demostrado efectos beneficiosos a nivel pulmonar con la administración de estrógenos, debemos tener en cuenta algunos efectos deletéreos. Las

neoplasias malignas de pulmón son una de las principales causas de mortalidad relacionadas con cáncer en las mujeres (Jemal et al. 2010a). Se ha sugerido además que las hormonas femeninas podrían ejercer un papel en su patogenia, particularmente en el desarrollo del adenocarcinoma de pulmón, el tipo más frecuente en no fumadores (Taioli y Wynder 1994; Subramanian y Govindan 2007; Jemal et al. 2010b). No obstante, los datos epidemiológicos en relación a la influencia de la terapia hormonal sustitutiva sobre la génesis del cáncer de pulmón en las mujeres son contradictorios, con estudios recientes demostrando una ausencia de asociación (Bae y Kim 2015). Por otro lado, la terapia hormonal sustitutiva tras el climaterio podría incrementar el riesgo de desarrollar cáncer de mama según los esquemas empleados (Chlebowski y Anderson 2012).

Merece la pena por tanto estudiar otras opciones de suplementos estrogénicos. Los fitoestrógenos son compuestos presentes en algunas plantas y que muestran una estructura o función similar a los estrógenos de los mamíferos y sus metabolitos, pudiendo actuar tanto como agonistas como antagonistas. Entre sus efectos se han identificado acciones cardioprotectoras, de reducción de la osteoporosis y mejoría de las capacidades cognitivas (Dijsselbloem et al. 2004), así como de protección pulmonar, reduciendo el riesgo de desarrollo de EPOC (Hirayama et al. 2010) y mejorando el control del asma (Smith et al. 2004; Bime et al. 2011). Además, varios estudios epidemiológicos asocian el consumo de fitoestrógenos con una reducción del riesgo de desarrollo de cáncer de pulmón (Seow et al. 2002; Schabath et al. 2005; Shimazu et al. 2011) y de mama (Messina 2014; Setchell 2017). No, obstante, los mecanismos moleculares implicados en estas acciones protectoras no están del todo dilucidados.

Modelos animales utilizados

Puesto que el envejecimiento es un proceso multifactorial que ocurre en condiciones fisiológicas en todos los seres vivos, es fundamental para su estudio la disponibilidad de modelos adecuados que no hayan sido sometidos a manipulación experimental. Uno de los modelos más populares para el estudio del envejecimiento son las cepas SAM (*senescence-accelerated mice*), que desarrollan una rápida progresión hacia el envejecimiento una vez alcanzada la pubertad, y en las cuales la única manipulación ha sido la reproducción endogámica (Takeda et al. 1981).

En 1968 ratones AKR/J fueron donados a la Universidad de Kyoto. Allí los investigadores observaron que varios de sus descendientes presentaban una actividad física reducida, una pérdida de pelo y del brillo de éste, y una mortalidad más temprana. Entre 1972 y 1973 se seleccionaron cinco camadas de los ratones más exhaustos, a los que se denominó serie P (*senescence-accelerated prone*); así como tres camadas de ratones con envejecimiento normal, serie R (*senescence-accelerated resistant*). Desde entonces han surgido varias cepas SAMP a través de reproducción endogámica que desarrollan la mayoría de los cambios fenotípicos asociados al envejecimiento, como déficits de memoria, defectos inmunológicos, ritmo circadiano alterado, osteoporosis o artrosis (Takeda 1999). Se desconocen los factores genéticos asociados al envejecimiento acelerado que muestran los ratones SAMP. Se cree que la causa principal es un elevado nivel de estrés oxidativo secundario a disfunción mitocondrial (Mori et al. 1998; Hosokawa 2002).

Consecuentemente los ratones SAMP presentan un ciclo vital más corto, de entre 10 y 13 meses, que los ratones SAMR, con ciclos vitales de entre 17 y 20 meses (Takeda 1999). Constituyen por tanto un buen modelo para el estudio del envejecimiento que consigue reducir significativamente los tiempos de investigación, ya que muestran a edades más tempranas procesos y patologías asociados al envejecimiento. En concreto, se han realizado numerosas

investigaciones con ratones pertenecientes a la cepa SAMP8 empleando como control la cepa SAMR1, habiéndose establecido como un modelo para el estudio del envejecimiento (Kurokawa et al. 1998; Butterfield y Poon 2005; Rodríguez et al. 2007; Morley et al. 2012; Cuesta et al. 2013; Ginés et al. 2017).

2. Hipótesis y objetivos

El envejecimiento es un proceso multifactorial que conduce a cambios deletéreos en los seres vivos, alterando la arquitectura y función de los diferentes órganos y conduciendo a una pérdida de la homeostasis y de la adaptación al medio interno y externo. Las alteraciones asociadas al envejecimiento están relacionadas con un aumento del estrés oxidativo, una activación inflamatoria crónica secundaria a un proceso de inmunosenescencia en relación con la exposición continua a antígenos, y un desequilibrio entre las señales proapoptóticas y antiapoptóticas que puede conducir por un lado a la pérdida celular en tejidos y por otro al desarrollo de neoplasias.

El pulmón, al constituir una interfaz entre el medio interno y externo, está particularmente expuesto a agentes patógenos y contaminantes. Cabe esperar un incremento de los fenómenos de estrés oxidativo, inflamación y apoptosis en el tejido pulmonar con el envejecimiento, asociando una pérdida de funcionalidad. Además, estos fenómenos podrían verse agravados por la desregulación de ejes hormonales presente en el envejecimiento, entre ellos, la supresión hormonal secundaria al climaterio, y la reducción en la producción de melatonina.

El objetivo general de esta tesis doctoral ha sido investigar los mecanismos moleculares implicados en el envejecimiento pulmonar y su modulación a través de la administración de sustancias con actividad antioxidante e inmunomoduladora, melatonina y xantohumol, sobre un modelo animal de envejecimiento; así como el estatus inflamatorio y oxidativo pulmonar sobre un modelo animal de supresión estrogénica y su posible modulación con suplementación hormonal o con fitoestrógenos.

Para ello nos planteamos:

1. Determinar el efecto del envejecimiento sobre los niveles de citoquinas proinflamatorias, marcadores de estrés oxidativo y mediadores apoptóticos en pulmón de ratones SAMP8 y SAMR1.
2. Determinar el efecto de la administración crónica durante 30 días de melatonina y de xantohumol sobre dichos parámetros.
3. Determinar la relación entre envejecimiento pulmonar, producción de surfactante y el estatus oxidativo de neumocitos tipo II en ratas.
4. Determinar el efecto de la administración crónica de melatonina sobre los parámetros anteriores.
5. Determinar la implicación de la supresión estrogénica sobre el estatus oxidativo en el envejecimiento pulmonar y sobre la producción de surfactante pulmonar en ratas ooforectomizadas, con ratas hembra intactas y ratas macho como controles.
6. Determinar los efectos de la suplementación hormonal con 17- β -estradiol y con fitoestrógenos en ratas ooforectomizadas sobre los fenómenos anteriores.

3. Material y métodos

1. Experimentos sobre pulmón en modelo animal de envejecimiento acelerado

Animales

Se emplearon ratones macho proclives al envejecimiento acelerado (SAMP8) y resistentes a este envejecimiento (SAMR1) de 2 (jóvenes) y de 10 (viejos) meses de edad, de progenitores procedentes de la colonia propia del Animalario de la Universidad de Granada. Los animales se alojaron en grupos de 6-7 ratones en jaulas de policarbonato (MacrolonR, Panlab, Barcelona, España) de 46,5 x 21,5 x 14,5 cm en el Animalario de la Universidad Complutense de Madrid a 22 ± 2 °C y 70% de humedad, bajo ciclos de luz automatizados de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Fueron alimentados *ad libitum* con una dieta estándar (A.04; Panlab, Barcelona, España) y agua. El estudio fue aprobado por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid. Se trató en todo momento a los animales según las Guías para el Cuidado Ético de Animales de Experimentación de la Unión Europea (2010/63/EU).

Tratamientos

Los animales se repartieron en seis grupos de experimentación: ratones jóvenes no tratados; viejos no tratados; viejos tratados con 1 mg/kg/día de melatonina; viejos tratados con 10 mg/kg/día de melatonina; viejos tratados con 1 mg/kg/día de xantohumol; y viejos tratados con 5 mg/kg/día de xantohumol. Se emplearon ratones SAMR1 tanto jóvenes como viejos como controles de sus respectivos grupos SAMP8. Los animales asignados al grupo de ratones tratados recibieron el tratamiento durante 30 días al cumplir los nueve meses de edad.

La melatonina (Actafarma, Madrid, España) se administró disuelta en etanol (Panreac Química S.A., Barcelona, España) en el agua de beber de los animales, de manera que se alcanzaron concentraciones finales de etanol del 0,066%. La dosis real de melatonina se calculó teniendo en cuenta esta dilución en el agua, la cantidad de agua consumida diariamente por los

animales y el peso de estos (unos 30 g). El consumo de agua diario fue de aproximadamente 8-10 mL. La melatonina se administró cada 24 h. Dado que estos animales son nocturnos, consumieron más del 80% del agua durante la fase de actividad, la noche. Los biberones de agua se cubrieron de papel de aluminio para protegerlos de la luz y el líquido se cambió tres veces a la semana, en función de la cantidad de agua consumida y el peso de los animales.

El xantohumol ($\geq 98\%$ de pureza, NIC Nookandeh Institute for Chemistry of Natural Substances, Hamburgo, Alemania) se administró disuelto en etanol añadido al agua de beber, de nuevo teniendo en cuenta el consumo diario de agua. La solución fue repuesta a diario y los animales tuvieron acceso a ella durante las 24 h del día.

Los grupos control (jóvenes y viejos no tratados) únicamente recibieron agua con etanol al 0,1%.

Tras 30 días de tratamiento, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical seguida de decapitación, y sus pulmones fueron recolectados para ser inmediatamente congelados en nitrógeno líquido. Los pulmones fueron almacenados en tubos *Eppendorf* estériles a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su procesamiento.

Determinaciones realizadas

Ratones tratados con melatonina

- Marcadores inflamatorios:
 - Expresión de mRNA (PCR): $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, $\text{NF}\kappa\text{B1}$ (subunidad p105), $\text{NF}\kappa\text{B2}$ (subunidad p100), NKAP (*NFκB activating protein*).
 - Expresión de proteínas (Western Blot): $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, $\text{NF}\kappa\text{B p50}$ (forma activada de p105), $\text{NF}\kappa\text{B p65}$ (forma activada de RelA).

- Marcadores de estrés oxidativo:
 - Expresión de mRNA (PCR): HO-1, HO-2, eNOS, iNOS.
 - Expresión de proteínas (Western Blot): HO-1.
 - Daño oxidativo sobre RNA: niveles cuantitativos de 8-hidroxiguanosina (8-OHG) mediante ELISA.
- Marcadores apoptóticos:
 - Expresión de mRNA (PCR): BAX, BAD, AIF, Bcl-2.
 - Expresión de proteínas (Western Blot): BAX, AIF.

Ratones tratados con xanthumol

- Marcadores inflamatorios:
 - Expresión de mRNA (PCR): TNF α , IL-1 β , NF κ B1 (p105), NF κ B2 (p100), NKAP.
 - Expresión de proteínas (Western Blot): TNF α , IL-1 β , NF κ B p105.
- Marcadores de estrés oxidativo:
 - Expresión de mRNA (PCR): HO-1, HO-2, eNOS, iNOS.
 - Expresión de proteínas (Western Blot): HO-1.

Extracción de mRNA y cuantificación mediante PCR

El mRNA procedente de los pulmones de los ratones macho se aisló mediante el kit RNeasy total RNA kit ref.50974104 (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza del RNA se estimó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, y la concentración de RNA se determinó mediante espectrofotometría. La transcripción inversa de 2

µg de RNA para la síntesis de DNA complementario (cDNA) se realizó empleando el Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, EE. UU.) y *primers* pd(N)6 (hexámeros aleatorios). La PCR en tiempo real (RT-PCR) se realizó en la máquina Applied Biosystems 7300 empleando la SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) y concentraciones de los *primers* específicos de 300 nM (Tabla 1). Las condiciones de termociclado fueron de 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min (seguido de 40 ciclos), 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 1 min, 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 30 s y 95 °C durante 15 s. Para la normalización de la carga de cDNA en la reacción de PCR, se realizó la amplificación de RNA ribosómico (rRNA) 18S para cada muestra. Los *primers* empleados se detallan en la Tabla 1. Los cambios relativos en la expresión génica se calcularon usando el método 2-ddCt (Livak y Schmittgen 2001).

Nombre	Secuencia (5'-3')	
18S	Sentido	GGTGCATGGCCGTTCTTA
	Antisentido	TCGTTCGTTATCGGAATTAACC
TNFα	Sentido	ATGAGAAGTTCCCAAATGGC
	Antisentido	CTCCACTTGGTGGTTTGCTA
IL-1β	Sentido	TGTGATGAAAGACGGCACAC
	Antisentido	CTTCTTCTTTGGGTATTGTTTGG
NFκB1	Sentido	CAGCTCTTCTCAAAGCAGCA
	Antisentido	TCCAGGTCATAGAGAGGCTCA
NFκB2	Sentido	TGGAACAGCCCAAACAGC
	Antisentido	CACCTGGCAAACCTCCAT
NKAP	Sentido	CGAGCTCTAAAGAGTCCCAAGA
	Antisentido	CCTCTGGGCCAATCAAATC
HO-1	Sentido	GTCAAGCACAGGGTGACAGA

	Antisentido	ATCACCTGCAGCTCCTCAAA
HO-2	Sentido	TACGGCACCAGAAAAGGAAA
	Antisentido	GTGCTTCCTTGGTCCCTTC
eNOS	Sentido	CCAGTGCCCTGCTTCATC
	Antisentido	GCAGGGCAAGTTAGGATCAG
iNOS	Sentido	CTTTGCCACGGACGAGAC
	Antisentido	TCATTGTACTCTGAGGGCTGAC
BAX	Sentido	GTGAGCGGCTGCTTGTCT
	Antisentido	GGTCCCGAAGTAGGAGAGGA
BAD	Sentido	GCCCTAGGCTTGAGGAAGTC
	Antisentido	CAAACCTCTGGGATCTGGAACA
AIF	Sentido	AGTCCTTATTGTGGGCTTATCAAC
	Antisentido	TTGGTCTTCTTAATAGTCTTGTAGGC
Bcl-2	Sentido	TGAGTACCTGAA CCGGCATCT
	Antisentido	GCATCCCAGCCTCCGTTAT

Tabla 1. Características de los *primers* empleados para RT-PCR.

Expresión de proteínas

La expresión de proteínas fue cuantificada mediante Western Blot (WB). Para ello las muestras de pulmón fueron homogeneizadas en tampón de lisis (100 mmol/L de NaCl, 10 mmol/L de TRIS-Cl (pH 7,6), 1 mmol/L de EDTA (pH 8), 1 µg/mL de aprotinina, 100 µg/mL de PMSF), se diluyeron (1:1) con tampón 2x (100 mmol/L de TRIS-HCl (pH 6,8), SDS al 4%, glicerol al 20%, azul de bromofenol al 0,1%, 200 mmol/L de ditiotretitol) y se hirvieron durante 10 min. La

concentración de proteína se midió mediante un kit BCA y lector de microplaca. Se separaron cantidades equivalentes de proteína (25 µg) por cada muestra mediante SDS-PAGE empleando geles de acrilamida al 10% y se transfirieron a una membrana PVDF mediante sistema semi-seco. Inmediatamente después la membrana se incubó en tampón bloqueador (leche desnatada al 5% en 20 mM de Tris, pH 7,5; 150 mM de NaCl; y Tween-20 al 0,01%) a 37 °C durante 1 h para evitar la unión inespecífica. Tras un lavado para eliminar los anticuerpos no unidos, la membrana se incubó con anticuerpos policlonales de conejo (1:1.000) durante 12 h a 4 °C, seguida de una incubación con peroxidasa de rábano unida covalentemente a anticuerpos secundarios IgG anti-conejo (1:7.000) (Transduction Lab, Lexington, KY, EE. UU.). Después de un nuevo lavado con TBS, las membranas se visualizaron mediante reactivos de quimioluminiscencia ECL Plus (AmershamLife Science Inc., Buckinghamshire, Reino Unido) sobre película de rayos X. Las películas se escanearon con un densitómetro (BioRad GS 800) para determinar las densidades ópticas relativas. Se emplearon marcadores proteicos pre-teñidos para las determinaciones del peso molecular. Como control interno, se determinó simultáneamente la expresión de β -actina reincubando las placas con anticuerpo para β -actina (1:5.000) (Santa Cruz, CA, EE. UU.). Los niveles de expresión proteica se normalizaron a los de los animales controles jóvenes (que se situaron en el 100%).

Medición de marcadores de daño oxidativo del RNA

La determinación del daño oxidativo del RNA se realizó mediante kit ELISA, con un ensayo competitivo para la medición cuantitativa de 8-hidroxiguanosina (8-OHG) (Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, EE. UU.). Para ello se añadieron las muestras de 8-OHG o estándares de 8-OHG a un conjugado 8-OHG/BSA adherido a una placa para EIA. Tras una breve incubación, se añadió un anticuerpo monoclonal para 8-OHG, seguido por un anticuerpo secundario unido a peroxidasa de rábano. El contenido de 8-OHG en muestras desconocidas se determinó mediante la

comparación con una curva estandarizada. Finalmente, los resultados se expresaron en ng/mg de RNA.

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media \pm la desviación estándar de la media del número de determinaciones. Los resultados se analizaron mediante test ANOVA seguido de análisis *post hoc* de Fisher. Únicamente se aceptaron como significativos los valores con $p < 0,05$.

2. Experimentos sobre neumocitos tipo II

Experimentos con administración de melatonina

Animales y tratamiento

Se emplearon ratas Wistar macho que fueron alojadas en jaulas de policarbonato (MacrolonR, Panlab, Barcelona, España) en el Animalario de la Universidad Complutense de Madrid a 22 ± 2 °C y 70% de humedad, bajo ciclos de luz automatizados de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Los animales fueron alimentados *ad libitum* con una dieta estándar (A.04; Panlab, Barcelona, España) y agua y asignados a cuatro grupos experimentales: jóvenes control (2 meses de edad), viejos control (24 meses de edad), viejos tratados con melatonina a 2,5 mg/kg/día y viejos tratados con melatonina a 5 mg/kg/día. El estudio fue aprobado por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid. Se trató en todo momento a los animales según las Guías para el Cuidado Ético de Animales de Experimentación de la Unión Europea (2010/63/EU).

A los 22 meses las ratas asignadas a los grupos de tratamiento recibieron melatonina añadida al agua de bebida durante 10 semanas. La melatonina se preparó y administró siguiendo el protocolo ya descrito en la sección previa. Las ratas fueron sacrificadas para la obtención de muestras a los 2 o a los 24 meses de edad, según el grupo experimental asignado, mediante decapitación, y sus pulmones se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido.

Experimentos sobre modelo animal de supresión estrogénica

Animales y tratamiento

Se emplearon en total 40 ratas macho y 66 ratas hembra de la cepa Wistar. Las ratas hembra se aleatorizaron para ser ooforectomizadas a los 12 meses de edad o bien para permanecer intactas. A los 22 meses de edad, las ratas ooforectomizadas se asignaron aleatoriamente a tres grupos: tratadas con 17- β -estradiol, tratadas con extracto de soja o no

tratadas, como se muestra en la Figura 1. Cada grupo experimental consistió en 6-8 ratas. Se administró estradiol subcutáneo a las ratas a una dosis de 125 µg/semana (β-Oestradiol Sigma-Aldrich S.L., Tres Cantos, España), disuelto en aceite de girasol mediante agitación con vórtex y ultrasonificación en un volumen de 100 µL por dosis. La suplementación con soja se realizó mediante la administración oral de cápsulas con extracto seco de hipocótilo de *Glycine max* (L.) Merr. (Phyto Soya® Arkopharma S.A., Madrid, España), que contenían etanol al 60% V/V como disolvente y un 10% de isoflavonas (17,5 mg por cápsula), calculadas como la suma de glucósidos de isoflavona (genistina, daidzina y glicitina). El extracto se prediluyó en etanol puro y a continuación en agua mediante agitación magnética y ultrasonificación al volumen calculado necesario para administrar una dosis de 312 mg/kg/día de extracto de soja añadido al agua de bebida (con un contenido final de etanol por botella del 1%), según el peso semanal de los animales y el consumo diario de agua.

Se obtuvieron muestras a los 2, 14, 18, 22 y 24 meses de edad para evaluar los posibles cambios en los niveles de marcadores de estrés oxidativo durante el envejecimiento en ratas macho, ratas hembra intactas y ratas ooforectomizadas, así como los efectos del estradiol y los fitoestrógenos sobre las ratas con supresión estrogénica. Los animales se mantuvieron a 22 ± 2 °C y 70% de humedad, bajo ciclos de luz automatizados de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Fueron alimentados *ad libitum* con una dieta estándar (A.04; Panlab, Barcelona, España) y agua. El estudio fue aprobado por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid. Se trató en todo momento a los animales según las Guías para el Cuidado Ético de Animales de Experimentación de la Unión Europea (2010/63/EU). Las ratas fueron sacrificadas mediante decapitación y sus pulmones se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para su ulterior procesamiento.

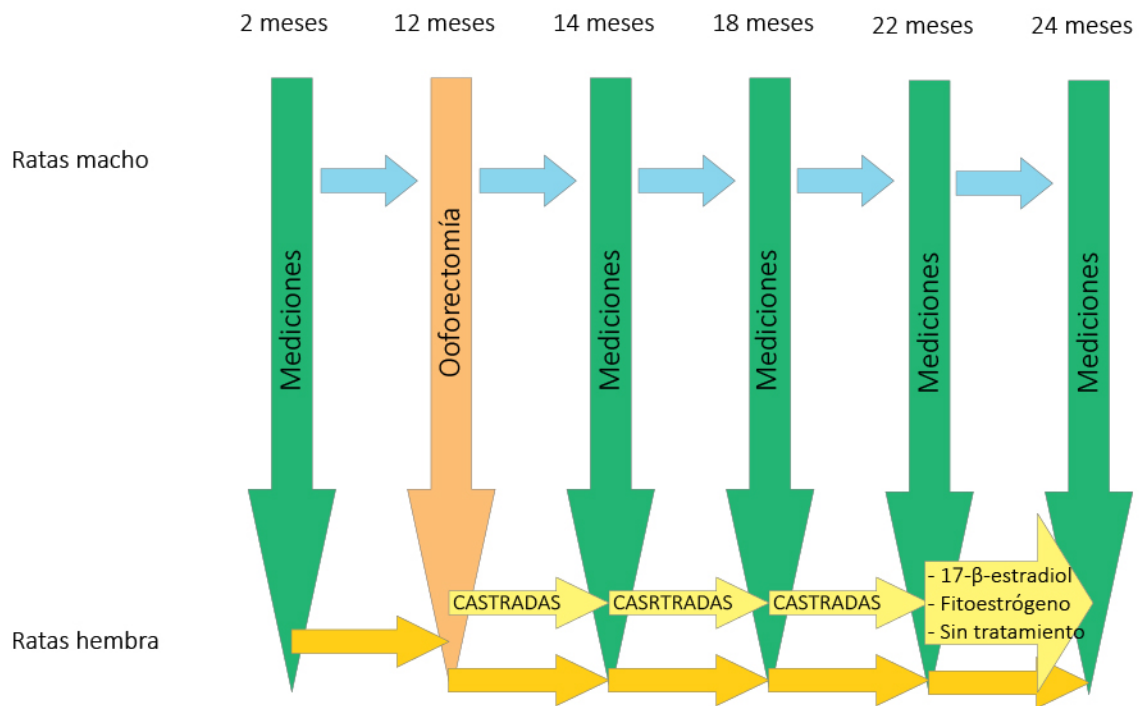


Fig. 1. Diseño del experimento sobre modelo animal de supresión estrogénica. Se obtuvieron muestras a los 2, 14, 18 y 22 meses de edad en ratas macho, hembras intactas y hembras ooforectomizadas a los 12 meses de edad. Al cumplir los 22 meses, las ratas ooforectomizadas recibieron tratamiento con 17-β-estradiol, extracto de soja o ningún tratamiento.

Aislamiento y cultivo de los neumocitos tipo II

Para la preparación de los neumocitos tipo II, se empleó solución I, consistente en 140 mmol/L de NaCl, 5 mmol/L de KCl, 2,5 mmol/L de Na₂HPO₄, 10 mmol/L de HEPES, 6 mmol/L de glucosa, 0,2 mmol/L de EGTA, y 10 µg/mL de DNasa. La solución II contenía los mismos componentes que la solución I, además de 2 mmol/L de CaCl₂, 1,3 mmol/L de MgSO₄, 27 U/mL de “orceína-elastina”, 0,5 mg/mL de tripsina, y 0,5 mg/mL (2,7 IU/mg) de collagenasa. Para aislar las células, el tejido pulmonar se aclaró con la solución I y se troceó en pequeños fragmentos, que se lavaron exhaustivamente con la misma solución para retirar las células sanguíneas. A continuación los fragmentos de pulmón se digirieron mediante dos exposiciones consecutivas a la solución II durante 20 min en un baño con agitación con agua a 37 °C. La digestión tisular fue terminada mediante la adición de suero fetal bovino a 4 °C. Se filtró la suspensión celular resultante a través de mallas de nylon (de 200 y 20 µm respectivamente) y se centrifugó a 250 g

durante 10 min. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en medio RPMI 1640. Tras su aislamiento, las células se cultivaron en RPMI con suero fetal bovino al 10%, 100 UI/mL de penicilina G y 50 µg/mL de gentamicina durante 90 min, durante los cuales la mayoría de los macrófagos alveolares se adhirieron al plástico. Tras 90 min, las células no adheridas se retiraron, se centrifugaron (250 g, 10 min) y se resuspendieron en la solución I. Para una mayor purificación, la suspensión se sometió a un gradiente Percoll creado mediante la centrifugación de Percoll con salino tamponado con fosfato, a una ratio de 6:7, durante 10 min a 20.000 g (Skillrud y Martin 1984). La viabilidad de las células, determinada por ensayo de exclusión con azul de tripano, fue del $96,9 \pm 9,1\%$. Tras su purificación, los neumocitos tipo II (106 células/mL) se cultivaron en micropocillos recubiertos de colágeno A y en medio RPMI 1640 con 10% de suero fetal bovino, 100 UI/mL de penicilina G y 50 µg/mL de gentamicina en una incubadora con aire con 95% O₂-5% CO₂ (37 °C, 24 h). El medio se renovó y se recultivó durante 24 h más. Tras el periodo de cultivo, se separaron las células del medio para realizar las diferentes mediciones.

Determinaciones realizadas

- Marcadores de estrés oxidativo: CO, LPO, NO, cGMP.
- Enzimas antioxidantes: catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR).
- Producción de surfactante pulmonar: concentraciones de fosfatidilcolina (PC).

Medición de cGMP y LPO

Las células fueron raspadas suavemente. El contenido celular de cGMP y de LPO se determinó mediante kits ELISA específicos.

Medición de la liberación de CO

Para cuantificar la cantidad de CO liberado, se midió la ratio de carboxihemoglobina tras la adición de hemoglobina. Se añadió hemoglobina (4 M) a las muestras, y la mezcla se dejó reaccionar durante 1 min para permitir la máxima unión de CO a la hemoglobina. A continuación las muestras se diluyeron con una solución con tampón fosfato (0,01 mol/L de fosfato de potasio monobásico/fosfato de potasio dibásico, pH 6,85) con ditionito de sodio. Tras incubación a temperatura ambiente durante 10 min, se midió la absorbancia a 420 y 432 nm contra curva elaborada solo con tampón.

Medición de la liberación de NO

La liberación de NO al medio se determinó mediante la reacción de Griess como la concentración de NO₂ tras la reducción de NO₃. Las muestras fueron desproteinizadas mediante la adición de ácido sulfosalicílico, e incubadas durante 30 min a 4 °C. A continuación, las muestras fueron centrifugadas durante 20 min a 12.000 g. Tras la incubación de los sobrenadantes con *Escherichia coli* productora de NO₃ reductasa (37 °C, 30 min), se añadió 1 mL de reactivo de Griess (dihidroclorato de naftilenediamina al 0,5%, sulfanilamida al 5%, H₃PO₄ al 25%). La reacción tuvo lugar a 22 °C durante 20 min, y se midió la absorbancia a 546 nm, empleando solución de NaNO₂ como estándar. La señal medida fue lineal desde 1 a 150 µM ($r = 0,994$, $p < 0,001$, $n = 5$), y el umbral de detección fue de 2 µmol/L.

Medición de la actividad de GR, GPx y CAT

Las actividades de las enzimas GR, GPx y CAT se midieron espectrofotométricamente mediante kits comerciales siguiendo las instrucciones del fabricante.

Determinación de la síntesis de surfactante

La síntesis de surfactante se determinó midiendo la incorporación de D-[U-14C] glucosa 10 mmol/L (12,5 Ci/mol, uniformemente marcada) a la PC. Para conseguirlo, los neumocitos tipo II (106 células/mL) se cultivaron en micropocillos recubiertos con colágeno A y en medio RPMI 1640 con suero fetal bovino al 10%, 100 UI/mL de penicilina G y 50 µg/mL de gentamicina en una incubadora con aire con 95% O₂-5% CO₂ (37 °C, 24 h). El medio se reemplazó con medio fresco y las células se cultivaron durante 24 h en presencia de D-[U-14C] glucosa. Tras el periodo de incubación, el medio se retiró y las células se congelaron inmediatamente en acetona enfriada con hielo seco. Tras la adición de metanol ácido, las células se sonicaron en un desintegrador ultrasónico MSE (Branson, Danbury, CT, EE. UU.), y se extrajeron los lípidos con 1,3 mL de cloroformo y 0,4 mL de solución de sal durante 1 h a temperatura ambiente. La fase orgánica se lavó a continuación 3 veces con 1 mL de fase acuosa consistente en cloroformo-metanol-sal-HCl (266:133:100:1, en volumen), tras la adición de 30 µL de lípidos de transferencia. La fase orgánica se secó y se reconstituyó en cloroformo-metanol (2:1). Las muestras con la fase orgánica reconstituida se colocaron sobre placas recubiertas de gel de sílice (Merck, Darmstadt, Alemania), ya preactivadas durante 1 h a 110 °C. La separación de los lípidos se realizó mediante cromatografía unidimensional según se había descrito previamente (Vara y Tamarit-Rodriguez 1989). Para identificar los lípidos, las placas se rociaron con 2',7'-diclorofluoresceína. Cada punto se raspó e incorporó a un vial de centelleo y se midió su radioactividad. Para excluir cualquier resto de marcador no incorporado se emplearon como controles experimentos en los que se añadió marcador justo antes de congelar las células. Se almacenó una alícuota congelada de suspensión celular para la determinación de proteínas mediante la tinción de Coomassie.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm la desviación estándar de la media. Las diferencias significativas entre los grupos se determinaron mediante el análisis de varianza de rangos de Friedman, seguido de test de Wilcoxon para datos apareados para identificar el origen de las diferencias. Se consideró significativo un intervalo de confianza del 95%. El análisis estadístico se realizó empleando el programa estadístico informático SPSS 23.

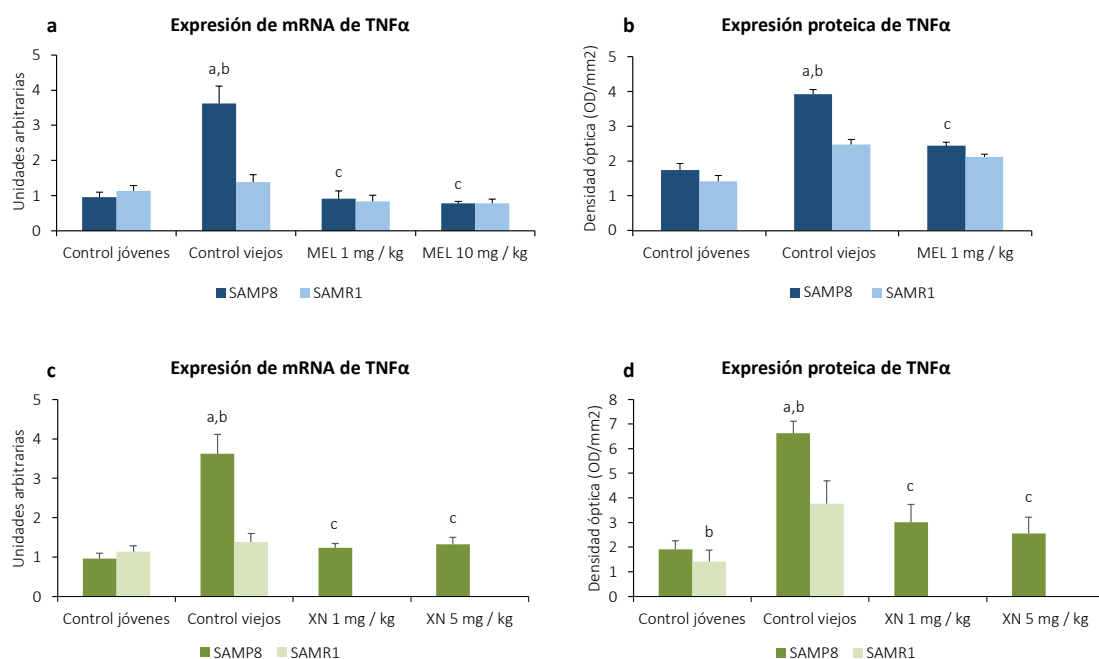
4. Resultados

1. Experimentos sobre pulmón en modelo animal de envejecimiento acelerado

1.1. Expresión de mediadores inflamatorios

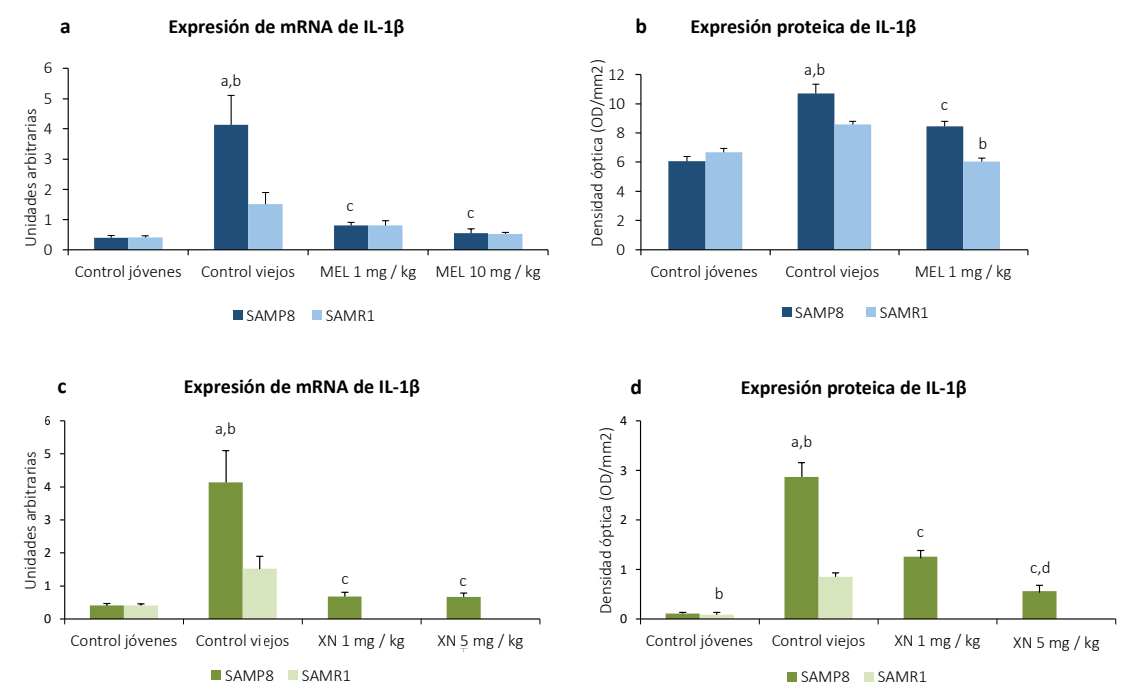
Factor de necrosis tumoral α (*tumor necrosis factor α* ; **TNF α**). El envejecimiento indujo un incremento en los niveles de mRNA de la citoquina proinflamatoria TNF α en los ratones SAMP8 viejos en comparación con los animales jóvenes de la misma cepa y en comparación con los ratones SAMR1 viejos ($p < 0,05$) (Figs. 2a y 2c). El tratamiento tanto con melatonina (Fig. 2a) como con xantohumol (Fig. 2c) a ambas concentraciones administradas fue capaz de reducir significativamente estos niveles ($p < 0,05$) en los ratones SAMP8 de 10 meses de edad (viejos). Las mismas diferencias fueron halladas en los niveles de expresión proteica de TNF α medidos mediante WB (Figs. 2b y 2d).

Figura 2. Expresión de mRNA y proteínas de TNF α . Niveles de TNF α en ratones SAMP8 y SAMR1 tratados con melatonina (a y b) o xantohumol (c y d), medidos mediante RT-PCR o WB, según se indique. a) $p < 0,05$ vs. jóvenes control SAMP8; b) $p < 0,05$ vs. viejos control SAMR1; c) $p < 0,05$ vs. viejos control SAMP8.



Interleuquina-1 β (*interleukin-1 β* ; IL-1 β). Los niveles de mRNA de la citoquina proinflamatoria IL-1 β se vieron así mismo aumentados de forma significativa con el proceso de envejecimiento, mostrando los ratones SAMP8 viejos concentraciones más altas respecto a los ratones jóvenes de la misma cepa y respecto a los ratones SAMR1 viejos ($p < 0,05$) (Fig. 3). La administración de melatonina (Fig. 3a) así como de xantohumol (Fig. 3c) a ambas dosis testadas fue capaz de revertir significativamente este aumento ($p < 0,05$). Estos efectos se repitieron en las mediciones realizadas sobre la expresión proteica mediante WB (Figs. 3b y 3d), encontrándose además una acción antiinflamatoria significativamente más potente con la administración de xantohumol a 5 mg/kg/día que a 1 mg/kg/día ($p < 0,05$).

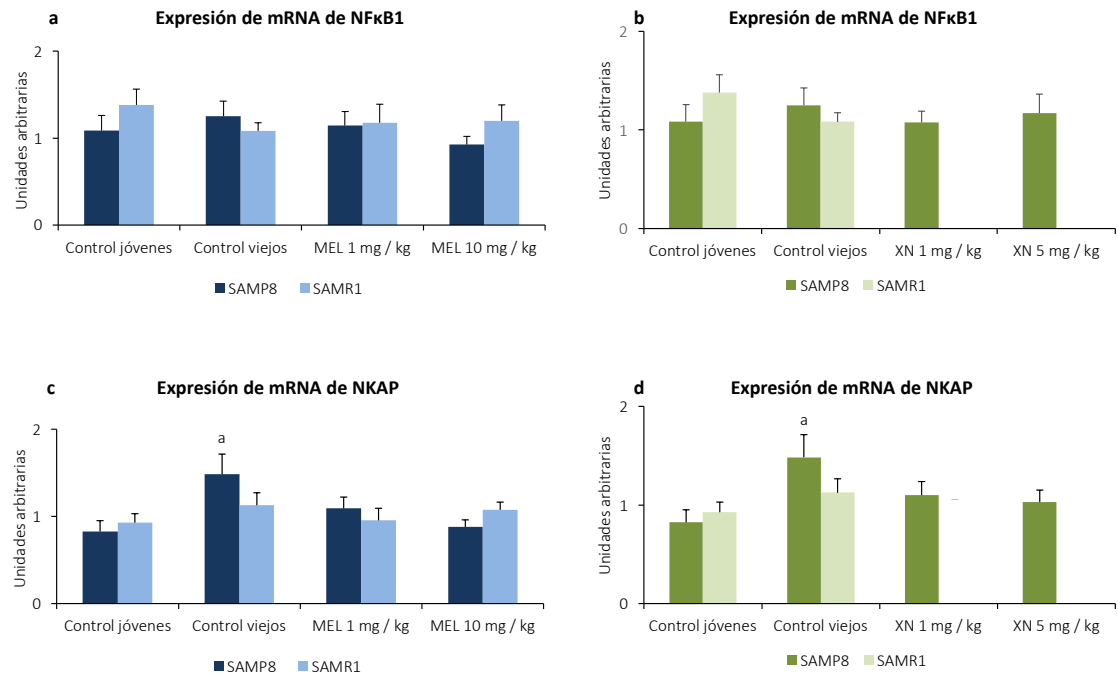
Figura 3. Expresión de mRNA y proteínas de IL-1 β . Niveles de IL-1 β en ratones SAMP8 y SAMR1 ratones tratados con melatonina (a y b) o con xantohumol (c y d), medidos mediante RT-PCR o WB, según se indique. a) $p < 0,05$ vs. jóvenes control SAMP8; b) $p < 0,05$ vs. viejos control SAMR1; c) $p < 0,05$ vs. viejos control SAMP8; d) $p < 0,05$ vs. viejos tratados con xantohumol a 1 mg/kg/día.



Factor de transcripción nuclear kappa B1 (*nuclear factor kappa B1*; NFκB subunidad p105 o NFκB1). Las mediciones de mRNA no mostraron diferencias significativas entre grupos en cuanto a los niveles de NFκB1 (Figs. 4a y 4b).

Proteína activadora de NFκB (*NF-kappa-B-activating protein*, NKAP). Los niveles de mRNA de los ratones SAMP8 viejos aumentaron significativamente respecto a sus controles jóvenes ($p < 0,05$). No se hallaron diferencias significativas con los ratones SAMR1 ni con la administración de melatonina (Fig. 4c) o xantohumol (Fig. 4d).

Figura 4. Expresión de mRNA de NFκB1 y NKAP. Niveles de NFκB1 (a y b) y NKAP (c y d) en ratones SAMP8 y SAMR1 tratados con melatonina (a y c) y xantohumol (b y d), medidos mediante RT-PCR o WB, según se indique. a) $p < 0,05$ vs. jóvenes control SAMP8.



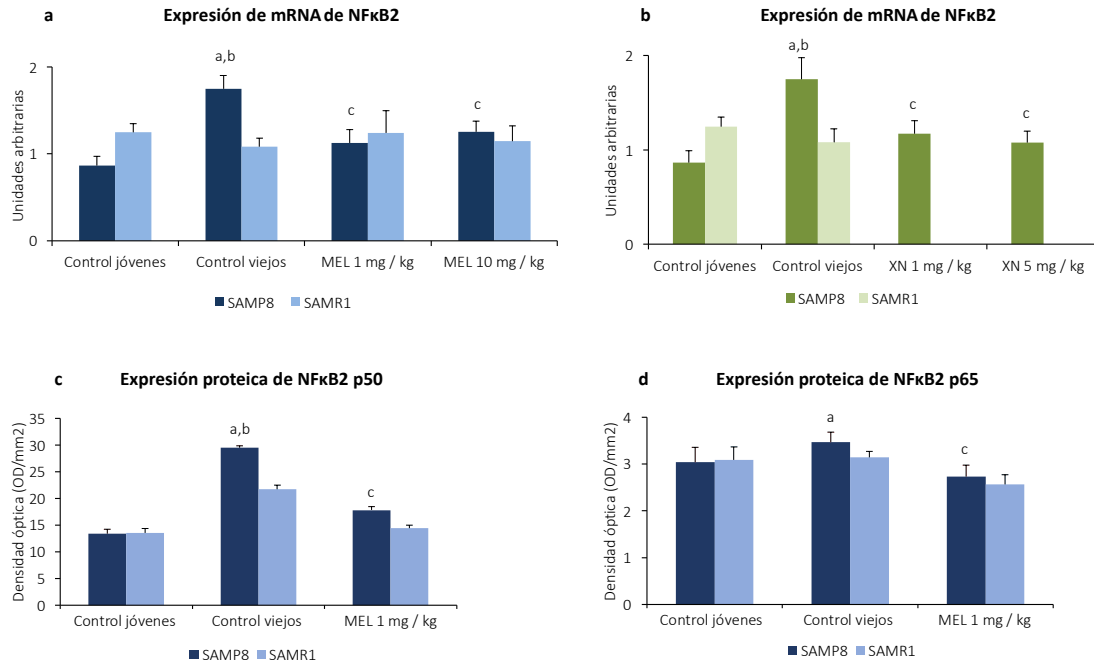
Factor de transcripción nuclear NFκB2 (*nuclear factor kappa B2*; NFκB subunidad p100 o NFκB2).

Se encontraron niveles significativamente aumentados de mRNA de NFκB2 ($p < 0,05$) en los ratones SAMP8 viejos en comparación con los ratones jóvenes de su misma cepa y con los ratones SAMR1 viejos, viéndose estos efectos neutralizados por la administración de melatonina (Fig. 5a) y de xanthumol ($p < 0,05$) (Fig. 5b).

NFκB subunidad p50 (forma activada de NFκB p105). Los ratones SAMP8 viejos mostraron una expresión proteica de NFκB p50 medida por WB significativamente más alta que los SAMP8 jóvenes o que los SAMR1 viejos ($p < 0,05$). El tratamiento con melatonina fue capaz de contrarrestar ese efecto ($p < 0,05$) (Fig. 5c).

NFκB subunidad p65 (forma activada de RelA). La expresión proteica medida por WB de NFκB p65 se vio incrementada en los ratones SAMP8 viejos respecto a sus controles jóvenes ($p < 0,05$). La administración de melatonina fue capaz de reducir de nuevo los niveles de NFκB p65 ($p < 0,05$) (Fig. 5d).

Figura 5. Expresión de mRNA y proteínas de NFκB2 y NFκB subunidad p50 y subunidad p65. Niveles de mRNA de NFκB2 en ratones tratados con melatonina (a) y xanthumol (b), medidos mediante RT-PCR, así como niveles de proteína de la subunidad p50 (c) y p65 (d), medidos mediante WB, en ratones tratados con melatonina. a) $p < 0,05$ vs. jóvenes control SAMP8; b) $p < 0,05$ vs. viejos control SAMR1; c) $p < 0,05$ vs. viejos control SAMP8.

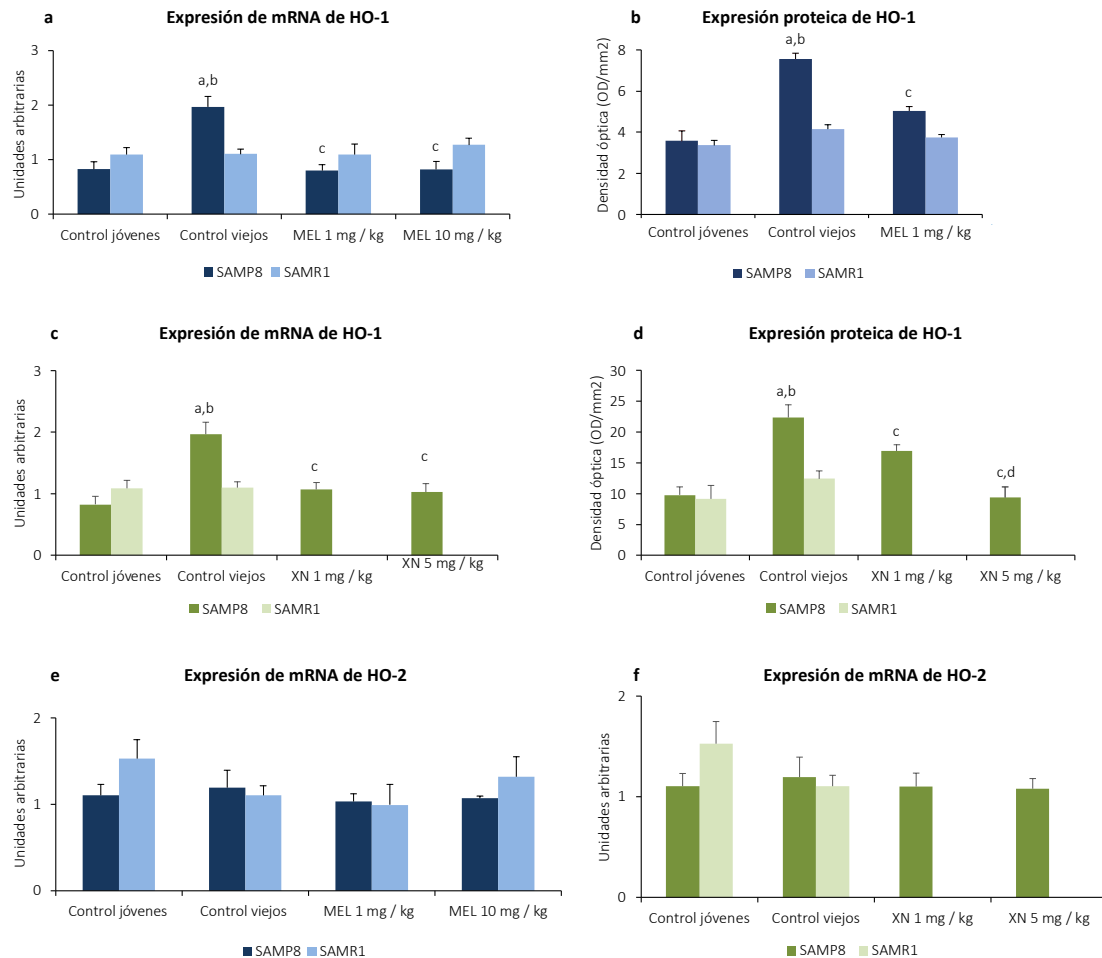


1.2. Expresión de marcadores de estrés oxidativo

Hemooxigenasa-1 (*hemoxygenase-1*; **HO-1**). Se produjo un incremento en los niveles de mRNA de HO-1 en ratones SAMP8 viejos en comparación con animales jóvenes de la misma cepa y en comparación con ratones SAMR1 viejos ($p < 0,05$) (Figs. 6a y 6c). El tratamiento tanto con melatonina (6a) como con xanthumol (6c) a ambas concentraciones administradas redujo significativamente los niveles medidos ($p < 0,05$) en los ratones SAMP8 de 10 meses de edad (viejos). Las mismas diferencias fueron halladas en los niveles de expresión proteica de HO-1 medidos mediante WB (Figs. 6b y 6d). En el caso del xanthumol, la dosis de 5 mg/kg/día fue significativamente más potente que la dosis de 1 mg/kg/día ($p < 0,05$).

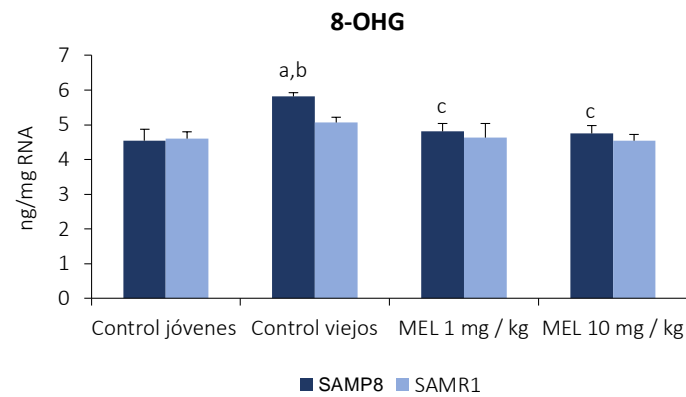
Hemooxigenasa-2 (*hemoxygenase-2*; **HO-2**). No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de mRNA de HO-2 entre grupos (Figs. 6e y 6f).

Figura 6. Expresión de mRNA y proteínas del sistema hemooxigenasa. Niveles de HO-1 en ratones tratados con melatonina (a y b) y tratados con xantohumol (c y d) en ratones SAMP8 y SAMR1 medidos mediante RT-PCR o WB, según se indique. a) $p < 0,05$ vs. jóvenes control SAMP8; b) $p < 0,05$ vs. viejos control SAMR1; c) $p < 0,05$ vs. viejos control SAMP8; d) $p < 0,05$ vs. viejos tratados con xantohumol a 1 mg/kg/día.



8-hidroxiguanosina (8-OHG). Se encontró un incremento de los niveles asociado al envejecimiento, siendo superiores en ratones SAMP8 viejos respecto a sus controles jóvenes y respecto a los SAMR1 viejos ($p < 0,05$). El tratamiento con melatonina consiguió revertir este efecto ($p < 0,05$) (Fig. 7).

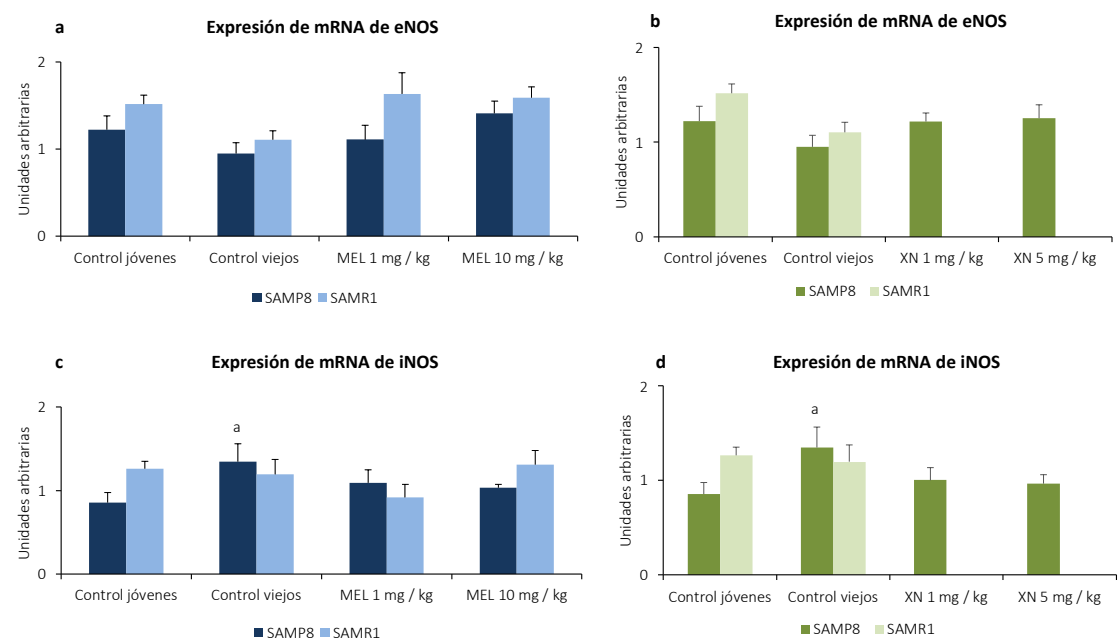
Figura 7. Niveles del marcador de oxidación de RNA 8-OHG. Niveles de 8-OHG en ratones SAMP8 y SAMR1 y efecto del tratamiento con melatonina a 1 mg/kg/día. a) $p < 0,05$ vs. jóvenes control SAMP8; b) $p < 0,05$ vs. viejos control SAMR1; c) $p < 0,05$ vs. viejos control SAMP8.



Óxido nítrico sintasa endotelial o constitutiva (*endothelial nitric oxide synthase*; **eNOS**). Las mediciones de mRNA no mostraron diferencias significativas entre grupos (Fig. 8a).

Óxido nítrico sintasa inducible (*inducible nitric oxide synthase*; **iNOS**). El envejecimiento resultó en un incremento de los niveles de mRNA de iNOS, y, por tanto, en diferencias significativas entre los ratones SAMP8 viejos y SAMP8 jóvenes ($p < 0,05$). No obstante, ninguno de los tratamientos consiguió revertir este efecto (Figs. 8c y 8d).

Figura 8. Expresión de mRNA de eNOS e iNOS. Niveles de eNOS e iNOS en ratones SAMP8 y SAMR1 tratados con melatonina (a y c) o xanthumol (b y d) medidos mediante RT-PCR. a) $p < 0,05$ vs. jóvenes control SAMP8.

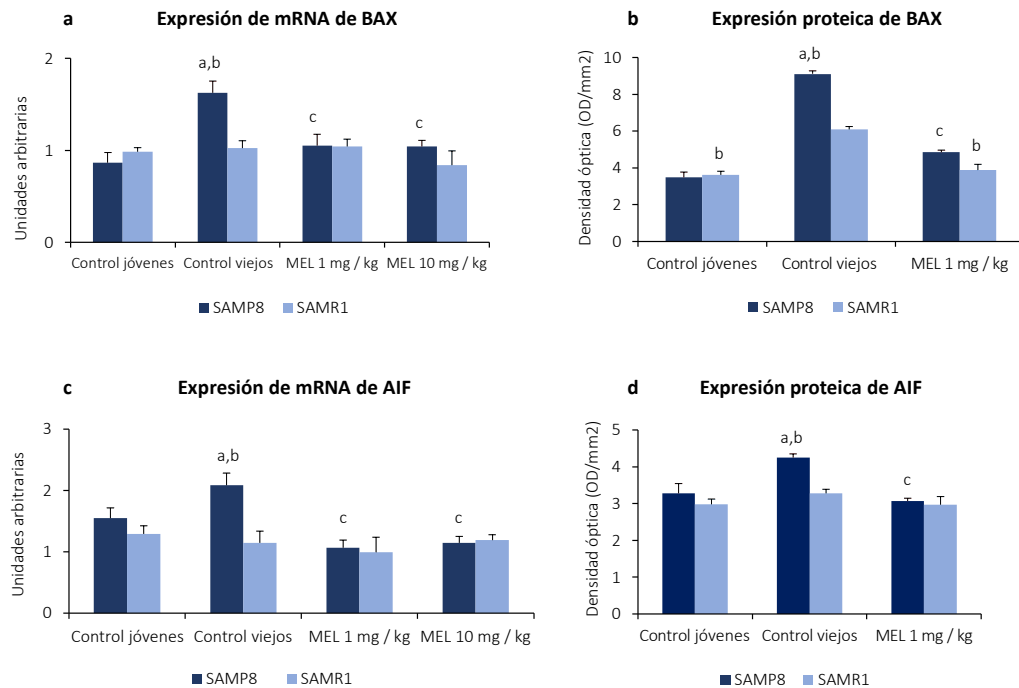


1.3. Expresión de mediadores apoptóticos

Proteína X asociada a la familia Bcl-2 (*Bcl-2-associated X protein*; **BAX**). El envejecimiento conllevó un incremento de la expresión de mRNA de BAX con niveles más elevados en ratones SAMP8 respecto a sus controles jóvenes y a los SAMR1 viejos ($p < 0,05$) (Fig. 9a). La expresión de proteína de BAX (Fig.9b) fue más elevada en ratones SAMP8 e incluso SAMR1 viejos respecto a sus controles jóvenes ($p < 0,05$). El tratamiento con melatonina logró contrarrestar estos efectos en ambas cepas de ratones ($p < 0,05$).

Factor inductor de la apoptosis (*apoptosis-inducing factor*; **AIF**). El envejecimiento indujo un incremento en los niveles de mRNA de AIF en ratones SAMP8 viejos en comparación con los SAMR1 viejos y con los SAMP8 jóvenes ($p < 0,05$) (Fig. 9c). El tratamiento con melatonina a ambas concentraciones administradas fue capaz de reducir significativamente estos niveles ($p < 0,05$) en los ratones SAMP8 de 10 meses de edad (viejos). Diferencias similares fueron halladas en los niveles de expresión proteica de AIF medidos mediante WB (Fig. 9d).

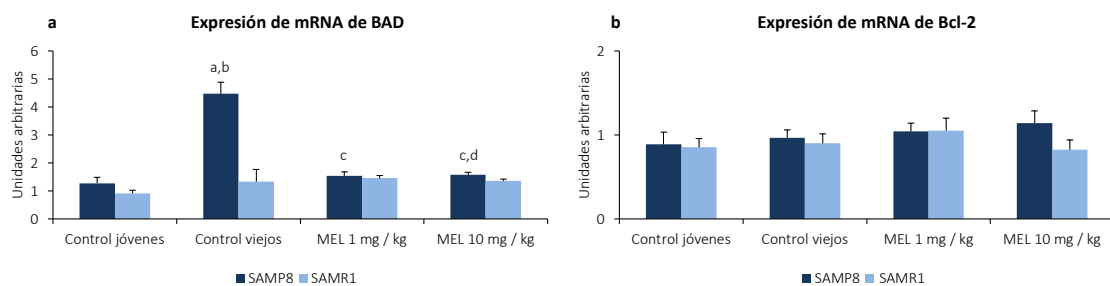
Figura 9. Expresión de mRNA y proteínas de los mediadores proapoptóticos BAX y AIF. Niveles de BAX (a y b) y AIF (c y d) en ratones SAMP8 y SAMR1 medidos mediante RT-PCR o WB, según se indique. a) $p < 0,05$ vs. jóvenes control SAMP8; b) $p < 0,05$ vs. viejos control SAMR1; c) $p < 0,05$ vs. viejos control SAMP8.



Promotor de muerte asociado a la familia Bcl-2 (*Bcl-2-associated death promoter*; BAD). Los niveles de mRNA de BAD se vieron incrementados con el envejecimiento, encontrándose diferencias significativas entre los ratones SAMP8 viejos y los SAMP8 jóvenes ($p < 0,05$) y los SAMP8 viejos con los SAMR1 de su misma edad ($p < 0,05$). El tratamiento con melatonina a ambas dosis consiguió reducir de nuevo la expresión de BAD ($p < 0,05$). En este caso se encontraron diferencias significativas, aunque probablemente no clínicamente relevantes, entre la expresión de mRNA de BAD con el tratamiento con melatonina de 1 mg/kg/día y de 10 mg/kg/día (Fig. 10a).

Proteína relacionada con el linfoma de células B 2 (*B cell lymphoma related protein*; Bcl-2). No se encontraron diferencias significativas en la expresión de mRNA de la proteína antiapoptótica Bcl-2 entre los grupos de estudio (Fig. 10b).

Figura 10. Expresión de mRNA de los mediadores apoptóticos BAD y Bcl-2. Niveles de BAD (a) y Bcl-2 (b) en ratones SAMP8 y SAMR1 medidos mediante RT-PCR. a) $p < 0,05$ vs. jóvenes control SAMP8; b) $p < 0,05$ vs. viejos control SAMR1; c) $p < 0,05$ vs. viejos control SAMP8; d) $p < 0,05$ vs. SAMP8 viejos tratados con melatonina a 1 mg/kg/día.



2. Experimentos sobre neumocitos tipo II

2.1. Resultados en machos de ratas Wistar tratados con melatonina

Guanosín monofosfato cíclico (*cyclic guanosine monophosphate*; **cGMP**). El envejecimiento indujo un incremento en la expresión de cGMP, viéndose diferencias significativas entre las ratas jóvenes y las viejas control ($p < 0,01$). Se hallaron diferencias significativas entre las ratas viejas control y las tratadas con melatonina a 2,5 mg/kg/día ($p < 0,05$) y a 5 mg/kg/día ($p < 0,01$). En este caso se hallaron también diferencias significativas entre ambas dosis administradas ($p < 0,05$) (Fig. 11).

Óxido nítrico (NO). De nuevo, el envejecimiento se asoció con un aumento significativo de los niveles de NO respecto a las ratas jóvenes ($p < 0,01$). En este caso, solo se hallaron diferencias significativas respecto a las ratas viejas control en las tratadas con melatonina a 5 mg/kg/día ($p < 0,05$) (Fig. 12).

Monóxido de carbono (CO). Las ratas viejas no tratadas mostraron niveles significativamente superiores de CO respecto a las ratas jóvenes ($p < 0,01$). El tratamiento con melatonina consiguió revertir este efecto, siendo más eficaz la dosis de 5 mg/kg/día que la de 2,5 mg/kg/día ($p < 0,05$) (Fig. 13).

Peroxidación lipídica (*lipoperoxides*; **LPO**). Los niveles de LPO fueron significativamente superiores en ratas viejas no tratadas que en ratas jóvenes ($p < 0,01$) y que en ratas tratadas con melatonina a dosis de 2,5 mg/kg/día ($p < 0,05$) y a dosis de 5 mg/kg/día ($p < 0,01$) (Fig. 14).

Fosfatidilcolina (*phosphatidylcholine*; **PC**). Las concentraciones de fosfatidilcolina se vieron reducidas significativamente con el envejecimiento, pudiendo los tratamientos con melatonina revertir este efecto ($p < 0,01$). La dosis de melatonina a 5 mg/kg/día se mostró más eficaz que la dosis a 2,5 mg/kg/día ($p < 0,05$) (Fig. 15).

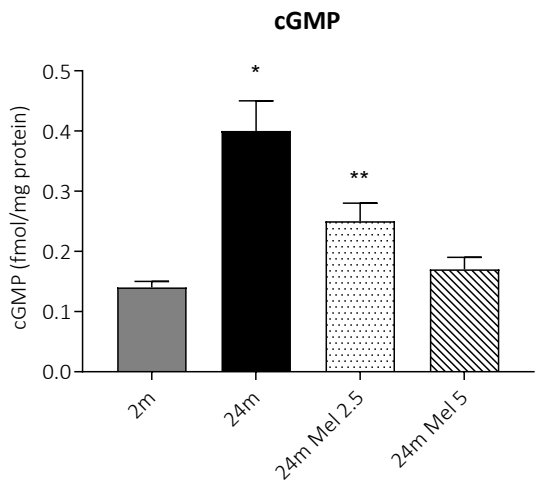


Figura 11. Niveles de cGMP en neumocitos tipo II en ratas Wistar macho. Concentraciones halladas en ratas de 2 meses (jóvenes), 24 meses (viejas), y viejas tratadas con 2,5 mg/kg/día o 5 mg/kg/día de melatonina. * $p < 0,01$ vs. 2 meses y 24 meses tratadas con 5 mg/kg/día de melatonina; ** $p < 0,05$ vs. resto de grupos.

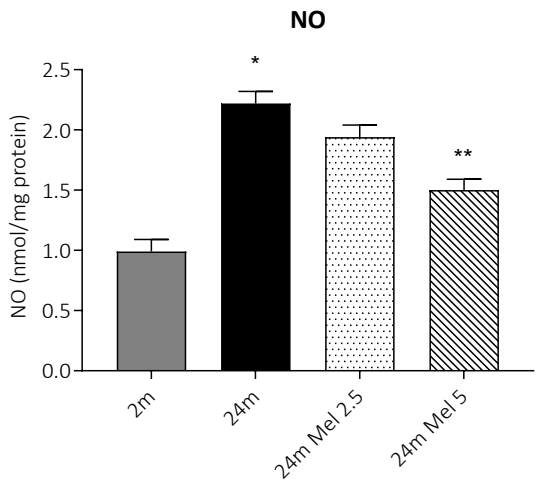


Figura 12. Niveles de NO en neumocitos tipo II en ratas Wistar macho. Concentraciones halladas en ratas de 2 meses (jóvenes), 24 meses (viejas), y viejas tratadas con 2,5 mg/kg/día o 5 mg/kg/día de melatonina. * $p < 0,01$ vs. 2 meses; ** $p < 0,05$ vs. resto de grupos.

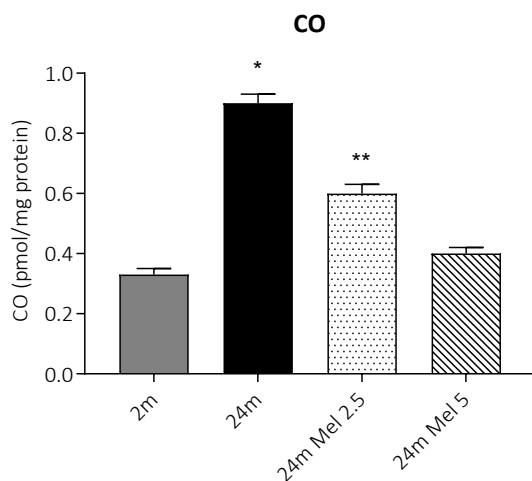


Figura 13. Niveles de CO en neumocitos tipo II en ratas Wistar macho. Concentraciones halladas en ratas de 2 meses (jóvenes), 24 meses (viejas), y viejas tratadas con 2,5 mg/kg/día o 5 mg/kg/día de melatonina. * $p < 0,01$ vs. 2 meses y 24 meses tratadas con 5 mg/kg/día de melatonina; ** $p < 0,05$ vs. resto de grupos.

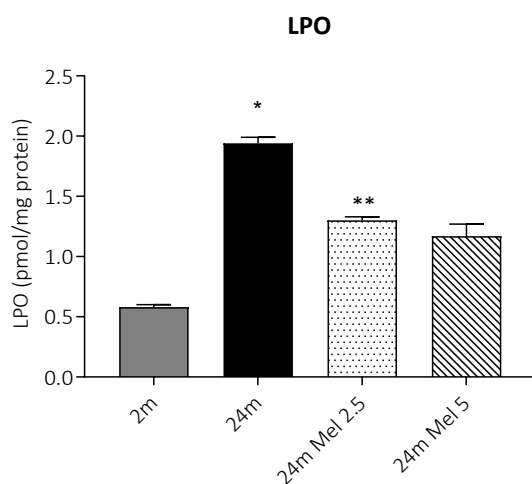


Figura 14. Niveles de LPO en neumocitos tipo II en ratas Wistar macho. Concentraciones halladas en ratas de 2 meses (jóvenes), 24 meses (viejas), y viejas tratadas con 2,5 mg/kg/día o 5 mg/kg/día de melatonina. * $p < 0,01$ vs. resto de grupos; ** $p < 0,05$ vs. 24 meses no tratadas.

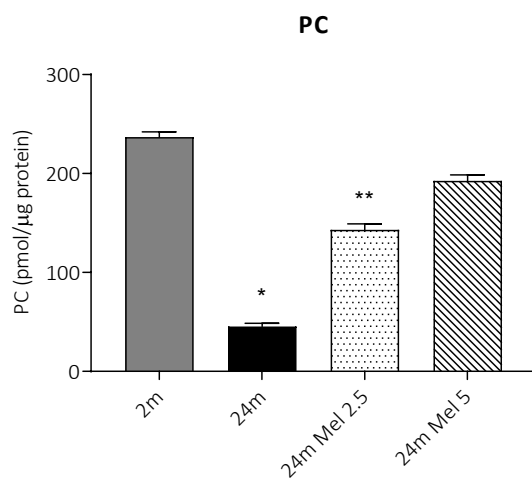


Figura 15. Niveles de PC en neumocitos tipo II en ratas Wistar macho. Concentraciones halladas en ratas de 2 meses (jóvenes), 24 meses (viejas), y viejas tratadas con 2,5 mg/kg/día o 5 mg/kg/día de melatonina. * $p < 0,01$ vs. resto de grupos; ** $p < 0,05$ vs. viejas tratadas con 5 mg/kg/día de melatonina.

2.2. Resultados sobre modelo de supresión estrogénica

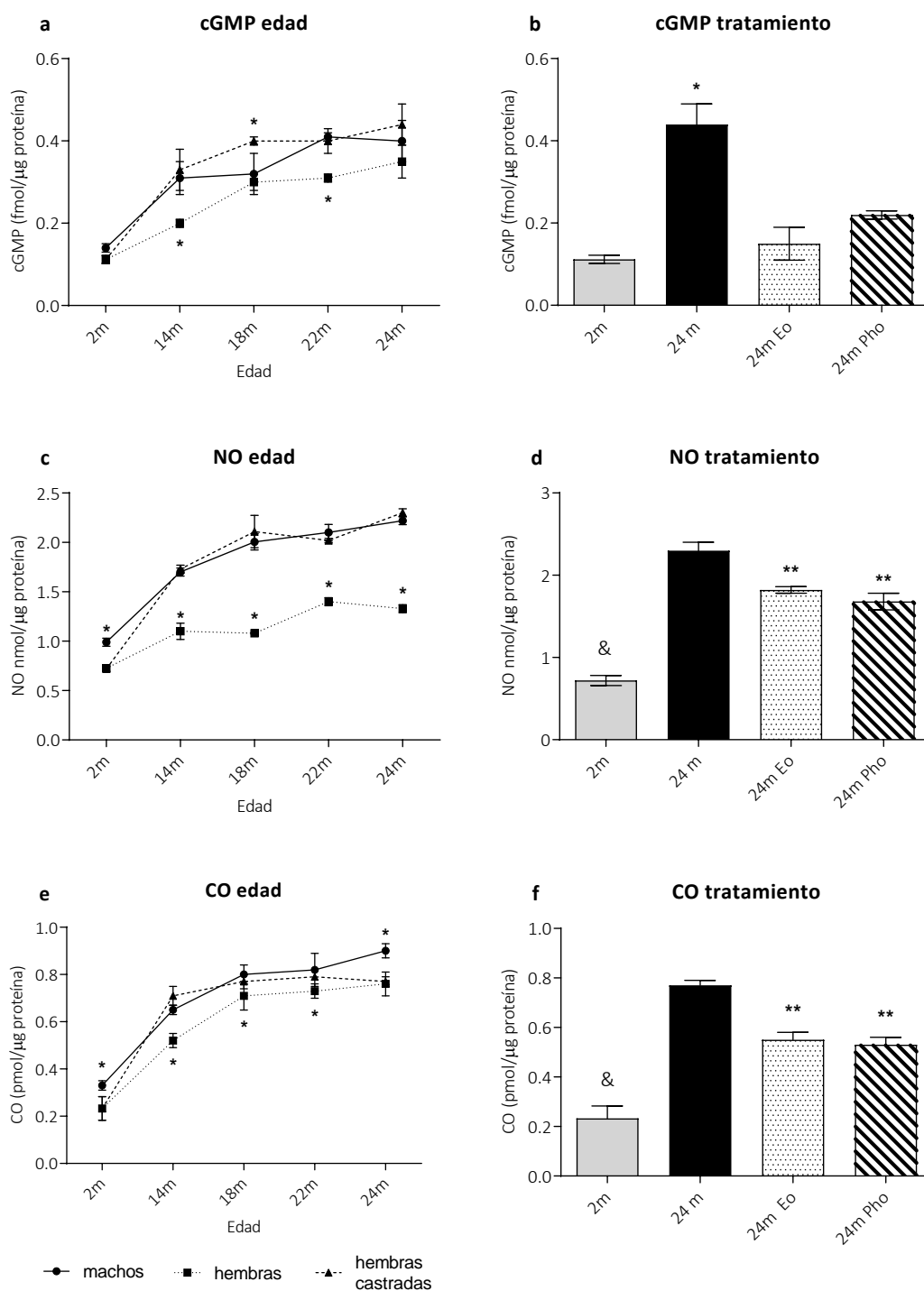
cGMP. El envejecimiento se asoció con un incremento progresivo de los niveles de cGMP en ratas Wistar macho, hembras intactas y hembras castradas ($p < 0,05$) (Fig. 16a). Los valores de cGMP fueron comparables en las ratas macho y en las hembras castradas, y en ambos grupos mayores que en las hembras control. No obstante, a los 18 meses de edad los valores en las hembras intactas se equipararon a los de los machos. El tratamiento con 17- β -estradiol y con fitoestrógenos se asoció a un descenso significativo en los niveles de cGMP en ratas castradas ($p < 0,05$) (Fig. 16b).

NO. Los niveles de NO en neumocitos tipo II a los 2 meses de edad fueron significativamente superiores en las ratas macho en comparación con las ratas hembra ($p < 0,05$). No obstante, entre los 14 y los 24 meses de edad, los valores de NO fueron similares entre las ratas macho y las ratas hembra castradas, mostrando un marcado aumento que no se observó en las ratas intactas ($p < 0,05$) (Fig. 16c). Cuando se administró 17- β -estradiol o fitoestrógenos los valores de NO disminuyeron de forma significativa en las ratas castradas ($p < 0,05$) (Fig. 16d).

CO. El envejecimiento se asoció a un incremento significativo en las concentraciones de CO en neumocitos tipo II en ratas macho, hembras y hembras castradas ($p < 0,05$). Los niveles de CO en las ratas hembra control permanecieron significativamente más bajos que aquellos presentados en las ratas macho o en las hembras castradas a los 14, 18 y 22 meses de edad ($p < 0,05$). A los 24 meses de edad, no obstante, los valores de CO resultaron equivalentes en las ratas castradas y en las intactas, aunque menores que en machos (Fig. 16e). Cuando se administró estradiol o extracto de soja a las hembras castradas se observó una marcada reducción en las

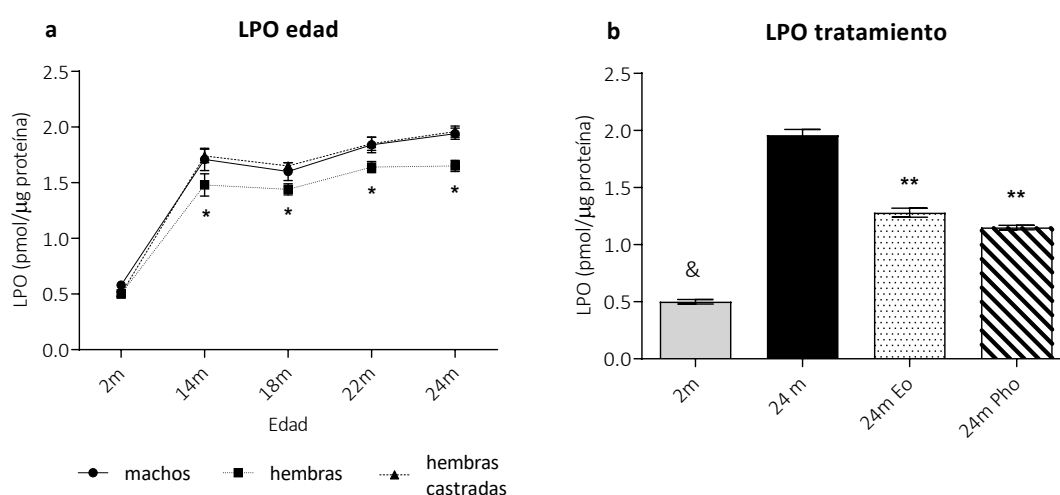
concentraciones de CO al compararse con las ratas castradas no tratadas de 24 meses de edad ($p < 0,05$) (Fig. 16f). No se observaron diferencias entre tratamientos.

Figura 16. Niveles de cGMP (a y b), NO (c y d) y CO (e y f) en neumocitos tipo II en ratas Wistar. Diferencias con la edad y entre grupos (machos, hembras ooforectomizadas y hembras intactas; izquierda) y entre grupos de tratamiento (hembras intactas de 2 meses de edad, hembras ooforectomizadas de 24 meses de edad no tratadas, hembras ooforectomizadas de 24 meses de edad tratadas con 17- β -estradiol y hembras ooforectomizadas de 24 meses tratadas con fitoestrógenos; derecha). * $p < 0,05$ vs. resto; & $p < 0,01$ vs. 24 meses de edad; ** $p < 0,05$ vs. 24 meses de edad.



LPO. Los niveles de lipoperóxido aumentaron exponencialmente entre los 2 y los 14 meses de edad en los tres grupos. Entre los 14 y los 24 meses de edad, las concentraciones de LPO mostraron un incremento progresivo que fue menos marcado en las hembras no castradas de 14, 18, 22 y 24 meses ($p < 0,05$) (Fig. 17a). Tanto el tratamiento con 17- β -estradiol como con fitoestrógenos disminuyó significativamente los niveles de LPO en neumocitos tipo II de las ratas ooforectomizadas ($p < 0,05$) (Fig. 17b).

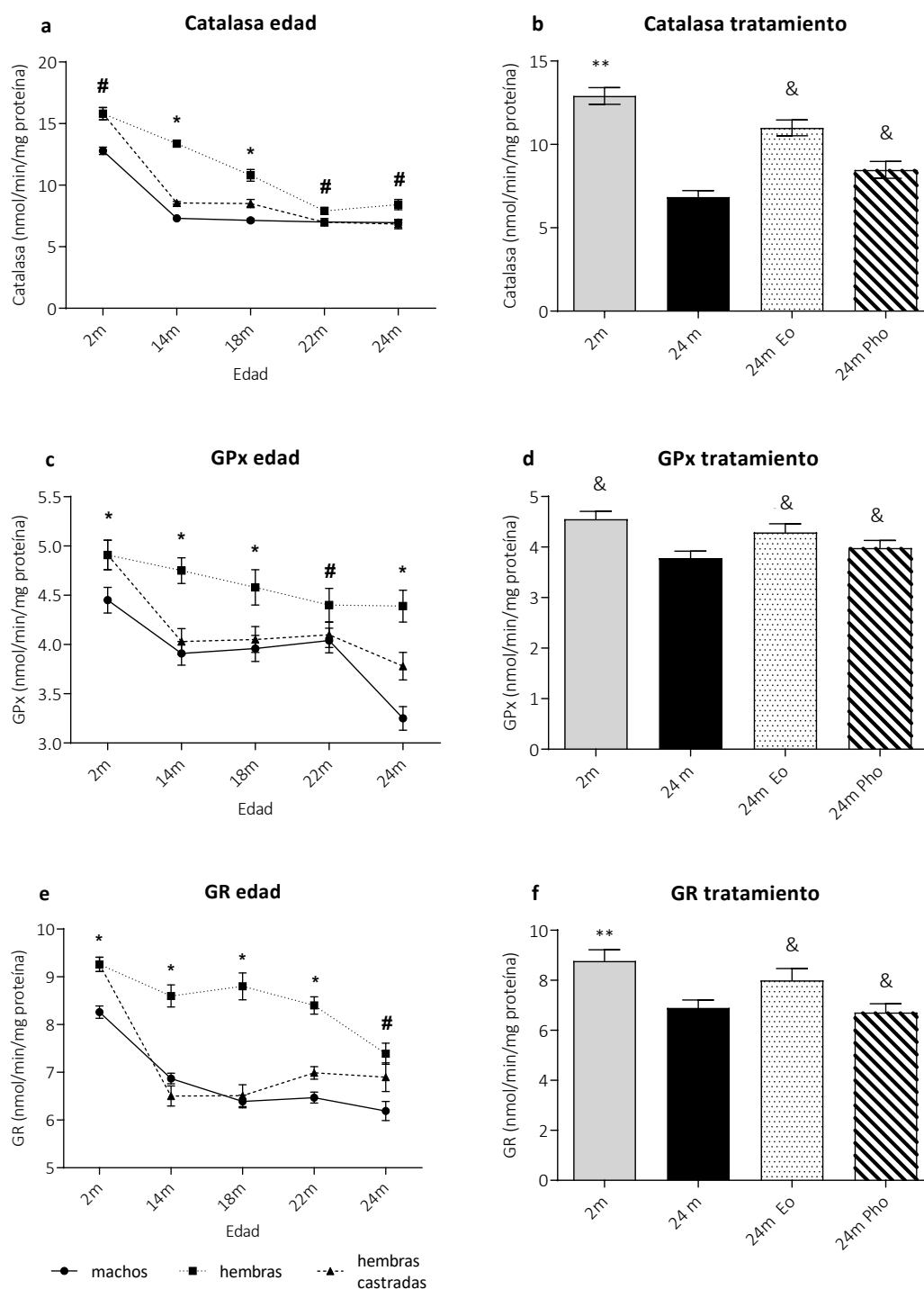
Figura 17. Niveles de LPO en neumocitos tipo II en ratas Wistar. Diferencias con la edad y entre grupos (machos, hembras ooforectomizadas y hembras intactas; a), izquierda) y entre grupos de tratamiento (hembras intactas de 2 meses de edad, hembras ooforectomizadas de 24 meses de edad no tratadas, hembras ooforectomizadas de 24 meses de edad tratadas con 17- β -estradiol y hembras ooforectomizadas de 24 meses tratadas con fitoestrógenos; b), derecha). * $p < 0,05$ vs. resto; & $p < 0,01$ vs. 24 meses de edad; ** $p < 0,05$ vs. 24 meses de edad.



Catalasa (CAT). La actividad de la enzima antioxidante CAT disminuyó con la edad en todos los grupos; no obstante, fue significativamente más alta en ratas hembra intactas de 14 y de 18 meses de edad en comparación con las hembras castradas ($p < 0,05$) (Fig. 18a). La administración de 17- β -estradiol o de fitoestrógenos restauró parcialmente la actividad de la CAT en ratas ooforectomizadas ($p < 0,01$) (Fig. 18b).

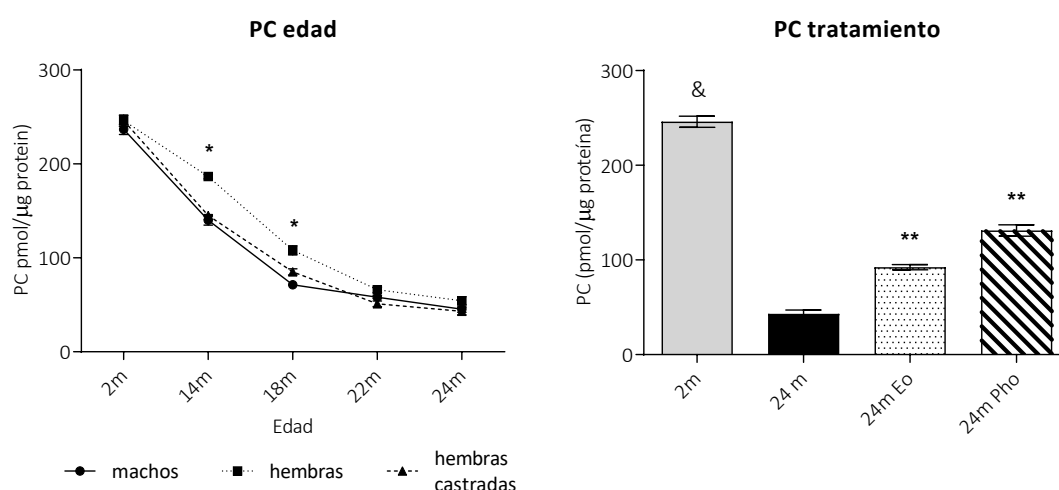
Glutación peroxidasa (GPx) y reductasa (GR). La actividad de la GPx se vio disminuida en ratas macho y en ratas hembra ooforectomizadas cuando se comparó con las ratas intactas de la misma edad ($p < 0,05$) (Fig. 13c). El tratamiento con 17- β -estradiol o con fitoestrógenos revirtió los efectos de la ooforectomía sobre la actividad de la GPx ($p < 0,01$) (Fig. 13d). De forma similar, la actividad de la GR disminuyó con la edad y se vio reducida en machos y en hembras ooforectomizadas al compararse con ratas hembra intactas ($p < 0,05$) (Fig. 18e). La administración tanto de 17- β -estradiol como de fitoestrógenos restauró parcialmente la actividad de la GR en animales ooforectomizados ($p < 0,01$) (Fig. 18f).

Figura 18. Actividad de la CAT (a y b), la GPx (c y d) y la GR (e y f) en neumocitos tipo II en ratas Wistar. Diferencias con la edad y entre grupos (machos, hembras ooforectomizadas y hembras intactas; izquierda) y entre grupos de tratamiento (hembras intactas de 2 meses de edad, hembras ooforectomizadas de 24 meses de edad no tratadas, hembras ooforectomizadas de 24 meses de edad tratadas con 17- β -estradiol y hembras ooforectomizadas de 24 meses tratadas con fitoestrógenos; derecha). * $p < 0,05$ vs. resto; # $p < 0,05$ vs. machos; & $p < 0,01$ vs. 24 meses de edad; ** $p < 0,05$ vs. 24 meses de edad.



PC. La síntesis de PC disminuyó con la edad, con valores similares entre machos y hembras castradas. La síntesis de fosfolípidos en ratas hembra intactas fue significativamente más alta a los 14 y 18 meses de edad, pero equivalente a los otros grupos experimentales a los 2, 22 y 24 meses ($p < 0,05$) (Fig. 19a). Ambos tratamientos (17- β -estradiol y fitoestrógenos) restituyeron parcialmente la síntesis de PC en ratas hembra castradas viejas ($p < 0,05$) (Fig. 19b).

Figura 19. Niveles de PC en neumocitos tipo II en ratas Wistar. Diferencias con la edad y entre grupos (machos, hembras ooforectomizadas y hembras intactas; a), izquierda) y entre grupos de tratamiento (hembras intactas de 2 meses de edad, hembras ooforectomizadas de 24 meses de edad no tratadas, hembras ooforectomizadas de 24 meses de edad tratadas con 17- β -estradiol y hembras ooforectomizadas de 24 meses tratadas con fitoestrógenos; b), derecha). * $p < 0,05$ vs. resto; & $p < 0,01$ vs. 24 meses de edad; ** $p < 0,05$ vs. 24 meses de edad.



5. Discusión

Los resultados de la presente tesis doctoral relacionan el envejecimiento en ratones SAMP8 con una elevación de mediadores proinflamatorios: $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ y $\text{NF}\kappa\text{B}$. Varios estudios previos, algunos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación, han mostrado también un incremento en los niveles de $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ y $\text{NF}\kappa\text{B}$ (Tha et al. 2000; Forman et al. 2010; Kireev et al. 2010; Cuesta et al. 2011; Paredes et al. 2014), así como de HO-1 (Forman et al. 2010; Cuesta et al. 2011; Paredes et al. 2014) en páncreas, hígado, corazón, sangre y cerebro de ratones SAMP8 en contraste con ratones SAMR1. Otras investigaciones han asociado también el envejecimiento pulmonar a incrementos en la expresión de citoquinas proinflamatorias como $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 o $\text{IFN}\gamma$ (Li et al. 2011; Canan et al. 2014) y la familia de factores de transcripción nuclear $\text{NF}\kappa\text{B}$ (Ren et al. 2014). Todos estos datos son acordes a la teoría inflamatoria del envejecimiento que sugiere que el aumento con la edad en la expresión de mediadores proinflamatorios es, al menos en parte, responsable de un estatus de inflamación crónica y de los cambios degenerativos vistos en el envejecimiento.

Como ya se ha expuesto, la activación de la cascada inflamatoria induce un estado de producción de radicales libres, tanto de oxígeno como de nitrógeno, que son a su vez capaces de inducir la expresión de citoquinas amplificando y perpetuando la respuesta inflamatoria. La isoforma inducible de la NO sintasa, iNOS, ve incrementada su expresión durante la respuesta inflamatoria. Su papel es la producción masiva de óxido nítrico, que se combinará con radicales libres de oxígeno para generar especies reactivas de nitrógeno, con gran poder oxidativo. En concreto, la combinación del óxido nítrico con el radical superóxido conduce a la formación de peroxinitrito (ONOO^-), una de las especies reactivas de nitrógeno con mayor poder oxidante. En un contexto de defensa contra patógenos, esta respuesta es adaptativa. No obstante, durante la inflamación crónica vista en el envejecimiento constituye una fuente de daño oxidativo a los tejidos subyacentes, contribuyendo a la pérdida de funcionalidad molecular. Nuestros resultados relacionan el envejecimiento con una sobreexpresión de mRNA para iNOS en los ratones SAMP8

viejos en comparación con los jóvenes en tejido pulmonar, habiéndose encontrado previamente resultados similares en páncreas (Cuesta et al. 2011), hígado (Cuesta et al. 2011) y corazón (Forman et al. 2010). También hemos hallado un incremento en las concentraciones de NO y de su mensajero secundario, cGMP, presentes en neumocitos tipo II en machos de rata Wistar viejos en comparación con los jóvenes. Otras investigaciones previas han hallado un aumento en los niveles de nitritos y nitratos en mitocondrias de pulmón en ratones SAMP8 (Acuña-Castroviejo et al. 2012). Además de verse un aumento en la expresión de iNOS y en la producción de NO en un contexto de inflamación crónica, el envejecimiento se asocia a una sobreproducción de ambos dentro de la respuesta inflamatoria aguda a patógenos, habiéndose constatado mayores niveles de mRNA de iNOS y de productos de nitrosación de proteínas (nitrotirosina) en pulmones de ratones viejos en comparación con animales jóvenes en un modelo murino de endotoxemia (Starr et al. 2011).

El metabolismo del NO y sus cambios con la edad son complejos. Así, el NO es producido de forma constitutiva por la NOS en el endotelio vascular (eNOS) y difunde al músculo liso para inducir su relajación, empleando como segundo mensajero el cGMP. Además, el NO impide la agregación plaquetaria, por lo que una disminución en su producción puede favorecer la aparición de fenómenos trombóticos y de aterosclerosis (Ignarro y Napoli 2004), particularmente cuando existe un desequilibrio entre la expresión de iNOS y de eNOS. Nuestros resultados muestran una tendencia a la reducción en la expresión de mRNA de eNOS en pulmones de ratones SAMP8 con la edad, pero no alcanzan la significación estadística, habiendo estudios previos en pulmón con resultados similares (Starr et al. 2011). En general se acepta que la expresión de eNOS en el endotelio vascular disminuye con la edad (Sato et al. 1993; Matsushita et al. 2001), lo cual explica la elevada prevalencia de hipertensión y aterosclerosis en la población anciana.

Además de un incremento significativo en la expresión de mRNA de iNOS y una tendencia a la reducción de eNOS con la edad en muestras de pulmón de ratones SAMP8, nuestros resultados experimentales sobre neumocitos tipo II han mostrado un incremento de las concentraciones de NO y de cGMP en ratas viejas respecto a las jóvenes. Aunque por regla general se asocie la actividad de la iNOS a su expresión en macrófagos durante la respuesta inflamatoria y la actividad de la eNOS a su expresión en el endotelio como relajante de la musculatura lisa, las diferentes isoformas de la NOS se encuentran en diversos tejidos. Así, se ha caracterizado la expresión de iNOS y de bNOS (*brain nitric oxide synthase* u óxido nítrico sintasa cerebral, una de las isoformas constitutivas, así denominada por haberse observado por primera vez en cerebro) en neumocitos tipo II, habiéndose descrito un aumento en la expresión de iNOS secundario a la exposición a citoquinas proinflamatorias (TNF α , IL-1 β e IFN γ) y a LPS, de manera análoga a la expresión de iNOS en macrófagos, tanto en humano como en ratón (Asano et al. 1994; Gutierrez et al. 1995; Kwon et al. 2001; Sunil et al. 2002). En el caso de la estimulación por TNF α e IL-1 β , el incremento en la expresión de iNOS parece estar mediado por el factor de transcripción NF κ B (Kwon et al. 2001). Por lo tanto, no sólo los macrófagos alveolares y otras células del sistema inmune están implicadas en la respuesta inflamatoria pulmonar, sino también los neumocitos tipo II, siendo capaces de producir por sí mismos NO en grandes cantidades y contribuir a la formación de RNS. Nuestros resultados han mostrado un aumento en las concentraciones de TNF α , IL-1 β y NF κ B en pulmones de ratones SAMP8 viejos, así como un aumento significativo en la expresión de mRNA de iNOS, en ausencia de un proceso de inflamación aguda. Consecuentemente, la inflamación crónica vista en el envejecimiento podría mediar la activación de la expresión de iNOS a través de los mismos mecanismos que se han descrito para la inflamación aguda (TNF α , IL-1 β y NF κ B). La elevación de NO y cGMP en neumocitos tipo II que hemos hallado sugiere que esta vía de activación también podría tener lugar en dicho tipo celular.

La expresión de la enzima HO-1, implicada en el metabolismo del grupo hemo a biliverdina y bilirrubina, ambas con capacidad antioxidante, está regulada por una gran variedad de estímulos, siendo el elemento común entre ellos la presencia de estrés oxidativo (Maines 1997; Araujo et al. 2012), hasta el punto de ser considerada un marcador de estrés oxidativo. Su expresión se ha visto previamente elevada con el envejecimiento tanto en pulmón (Ito et al. 2009) como en otros tejidos (Cuesta et al. 2011; Fernández-García et al. 2019). En relación con esto, nuestros resultados también muestran un aumento en los pulmones de ratones SAMP8 viejos tanto de los niveles de mRNA como de proteína medida por WB. Por tanto, presumiblemente el envejecimiento se relaciona con un estatus de estrés oxidativo que conduce a la inducción de la expresión de HO-1 en tejido pulmonar. En efecto, el hallazgo en nuestras investigaciones de altos niveles de 8-hidroxiguanosina en ratones viejos se corresponde con un aumento en la oxidación de componentes celulares. Como respuesta a la presencia de ROS, la actividad de la HO-1 aumenta, lo cual supone una respuesta adaptativa ya que la actividad antioxidante de la biliverdina y la bilirrubina podría amortiguar los efectos del estrés oxidativo.

La degradación del grupo hemo por parte de la HO genera otro subproducto: el CO. El CO presenta actividad biológica, con algunas similitudes al NO: ambos tienen la capacidad de unirse a la guanilato ciclasa e inducir la producción de cGMP, aunque con menos eficacia en el caso del CO (Maines 1997). Además, tanto el CO como el NO pueden inhibir la actividad de la NOS. El sistema HO/CO ha llegado a considerarse incluso un componente de los sistemas de retroalimentación negativa del sistema NOS/NO, tanto por la capacidad del CO de inhibir la actividad de la NOS como por la degradación de la NOS, una hemoproteína, a cargo de la HO. En nuestra investigación se hallaron niveles aumentados de CO en neumocitos tipo II de ratas viejas; por otro lado, en pulmón de ratones SAMP8 se observó un incremento de la HO-1 secundario al envejecimiento. Si asociamos ambos mecanismos, cabría pensar que el aumento en los niveles de CO podría ser consecuencia de una activación de la HO-1. Esta deducción se relaciona con el

hecho de que la principal fuente endógena de CO es el metabolismo del hemo a cargo de la hemooxigenasa (Arias-Díaz et al. 1997; Maines 1997).

Hemos visto que nuestros resultados muestran un perfil proinflamatorio y prooxidante en el envejecimiento pulmonar, tanto por los resultados observados en los ratones SAMP8 viejos en comparación con los SAMP8 jóvenes y con los SAMR1, como por los resultados observados en neumocitos tipo II de ratas viejas en comparación con las jóvenes. Además, hemos encontrado una elevación en la expresión de varios parámetros proapoptóticos en pulmones de ratones SAMP8 viejos respecto a los jóvenes y a los SAMR1, concretamente en los niveles de mRNA de BAD y en los niveles de mRNA y de expresión proteica de BAX y de AIF. No hemos hallado diferencias significativas asociadas al envejecimiento en la expresión de mRNA del mediador antiapoptótico Bcl-2. Todo esto sugiere un incremento de la apoptosis asociado al envejecimiento pulmonar. Otras investigaciones previas en nuestro grupo han hallado en hígado, páncreas y corazón un perfil proapoptótico desarrollado con el envejecimiento (Forman et al. 2010; Cuesta et al. 2011; Campillo et al. 2018; Fernández-García et al. 2019). Estos resultados son consistentes con los de otros grupos de investigación. Así, se ha descrito una mayor tasa de apoptosis en pulmones de ratones de 24 meses de edad (respecto a ratones menores de 9 meses de edad) sometidos a neumonectomía (Paxson et al. 2011) y en un modelo de envejecimiento homocigoto para la mutación klotho KL(-/-) (Ishii et al. 2008), así como un incremento en los mediadores proapoptóticos p53, p66^{Shc} y cisteín-proteasa 32 en ratas Wistar de un año de edad respecto a ratas de 3 meses de edad (Petrucelli et al. 2010). No obstante, otras investigaciones han hallado un incremento en las concentraciones de la molécula antiapoptótica Bcl-2 asociado al envejecimiento en pulmón, hígado, corazón, riñón y bazo de ratones CD-1 (López-Araiza et al. 2006), en contraste con resultados de páncreas de ratón SAMP8 que han descrito una disminución en los niveles de mRNA de Bcl-2 con el envejecimiento (Cuesta et al. 2011). En la presente investigación no se hallaron diferencias significativas en la expresión de mRNA de Bcl-2

entre ratones SAMP8 jóvenes y viejos o entre ratones SAMP8 y SAMR1, al igual que en otros estudios sobre hígado (Fernández-García et al. 2019). Aunque las investigaciones disponibles apuntan a que el envejecimiento se asocia a un perfil proapoptótico en tejido pulmonar (y en otros tejidos), la caracterización concreta de las moléculas implicadas requiere mayor estudio.

Los efectos de este estatus proinflamatorio, prooxidante y proapoptótico del envejecimiento sobre la producción de surfactante pulmonar no están del todo dilucidados, de manera que investigaciones previas apuntan a resultados contradictorios. Nuestros resultados muestran una reducción en la síntesis *de novo* de PC, el principal componente del surfactante pulmonar, en neumocitos tipo II de ratas Wistar (en machos, hembras intactas y hembras ooforectomizadas) con la edad. Se han descrito hallazgos similares sobre el contenido de fosfolípidos en lavado broncoalveolar en caballos viejos (Christmann et al. 2009). Estudios anatomopatológicos sobre ratón han mostrado alteraciones morfológicas con el envejecimiento en neumocitos tipo II, así como defectos en el tapiz de surfactante sobre el epitelio pulmonar (Walski et al. 2009). No obstante, otras investigaciones no corroboran dichos datos. En un estudio descriptivo sobre muestras cadavéricas de pulmón humano no se hallaron diferencias significativas en el contenido de PC saturada con la edad (Rebello et al. 1996). Por otro lado, el surfactante puede separarse mediante centrifugación diferencial en dos formas: en agregados grandes, su forma bioactiva, y en agregados pequeños, derivados de la degradación de los anteriores (Veldhuizen et al. 1996; Ruppert et al. 2003), por lo que la caracterización del surfactante con el envejecimiento también debería tener en cuenta cambios cualitativos. En un análisis sobre la cantidad y composición del surfactante pulmonar y la capacidad para la reducción de la tensión superficial en ratones de 22 meses de edad no se encontraron diferencias significativas respecto a ratones de 4 meses (Veldhuizen et al. 2019). Estos resultados son inconsistentes con los publicados por Ueda y cols., que describen un incremento gradual con la edad en la proporción de agregados grandes y una reducción en la degradación de agregados

grandes a pequeños en ratas de 24 meses respecto a jóvenes (Ueda et al. 2000). Este cambio cualitativo no se acompañó de cambios significativos en la cantidad de PC saturada medida en ratas de 3, 16 o 24 meses de edad.

A tenor de todos estos datos, la caracterización del estatus del surfactante pulmonar con el envejecimiento es compleja. Nuestros resultados apuntan a una reducción en la capacidad de síntesis de surfactante a cargo de los neumocitos tipo II secundaria al envejecimiento pulmonar en ratas Wistar. Según investigaciones previas, esta reducción en la capacidad de síntesis no tendría por qué conducir a una disminución en la cantidad de surfactante pulmonar en individuos envejecidos, ya que podría verse acompañada de una reducción en su degradación, quedando inalterada su capacidad tensioactiva. No obstante, estos datos podrían apuntar a una pérdida en la capacidad de restauración del surfactante tras una lesión pulmonar aguda en individuos envejecidos. La producción de surfactante pulmonar podría verse alterada durante la inflamación aguda, habiéndose observado la capacidad del LPS de reducir la síntesis de surfactante pulmonar *in vitro* al inhibir la actividad de la acil-CoA:lisofosfatidilcolina aciltransferasa 1 (Zou et al. 2011). También se han descrito reducciones en la cantidad de fosfolípidos en el surfactante de pacientes con síndrome de distrés respiratorio agudo (Günther et al. 1996), así como alteraciones cualitativas en modelos de sepsis (Huang 2005). Se necesitan futuros estudios sobre la síntesis y cantidad de surfactante con el envejecimiento, incluyendo también el contexto de inflamación aguda, para la interpretación de estos datos. Debemos tener en cuenta, además, que aparentemente existen grandes diferencias entre especies en relación al contenido pulmonar de surfactante, siendo menor en humanos que en otras especies (Rebello et al. 1996), por lo que cualquier extrapolación de estudios experimentales animales debe realizarse con cautela.

Como hemos visto anteriormente, la melatonina es una molécula que ha demostrado capacidad antioxidante, antiinflamatoria y antiapoptótica *in vivo* (Hardeland 2018), cuya síntesis

se ve disminuida con el envejecimiento. Por tanto, cabe esperar que su administración contrarreste los efectos proinflamatorios, prooxidantes y proapoptóticos asociados a la edad. Nuestros resultados han mostrado en tejido pulmonar un efecto antiinflamatorio de la administración de melatonina, que ha sido capaz de contrarrestar la elevación de mRNA y expresión proteica de las citoquinas TNF α y de IL-1 β secundaria al envejecimiento. No se encontraron diferencias significativas entre las dosis de 1 mg/kg/día y 10 mg/kg/día. Estos resultados son acordes a investigaciones previas *in vivo* (Cuesta et al. 2011; Majidinia et al. 2018). En cuanto a la familia de factores de transcripción nuclear NF κ B, con actividad proinflamatoria, el envejecimiento indujo una elevación en los niveles de mRNA de NF κ B2, que fue contrarrestado por la administración de melatonina tanto a 1 como a 10 mg/kg/día, y de la expresión proteica de NF κ B subunidad p50 y subunidad p65, siendo la melatonina a la dosis de 1 mg/kg/día capaz de revertir estos efectos. No se hallaron diferencias significativas asociadas al envejecimiento ni a la administración de antioxidantes en la expresión de mRNA de NF κ B1. El envejecimiento sí provocó un incremento en la expresión de mRNA de NKAP, pero, en este caso, la melatonina mostró una tendencia a neutralizar estos efectos sin alcanzar la significación estadística. Investigaciones previas en hígado sí encontraron diferencias significativas con la edad en la expresión de mRNA de NF κ B1 y de NKAP que fueron contrarrestadas con la administración de 1 mg/kg/día de melatonina (Cuesta et al. 2010). Por el contrario, mediciones en páncreas en la expresión proteica de p65, p50 y p52 solo hallaron un incremento asociado al envejecimiento en los niveles de NF κ B p52, que fueron restaurados por la administración de melatonina a la dosis de 10 mg/kg/día pero no a la de 1 mg/kg/día (Cuesta et al. 2011). Por regla general, y a la luz de numerosas investigaciones previas, podemos afirmar que la melatonina inhibe la actividad del sistema NF κ B (Hardeland 2018). Así, se ha constatado su habilidad para inhibir la unión de p52 tras la exposición a LPS en macrófagos murinos *in vitro*, sin alterar la expresión de p100, la formación de p52 a partir de p100 ni la traslocación nuclear de p52 (Deng et al. 2006). La

melatonina también ha demostrado inhibir la actividad de p65 en un modelo murino de resorción ósea (Ping et al. 2017) y de neuroinflamación secundaria a la administración de D-galactosa (Ali et al. 2015). A tenor de estos datos, la melatonina presenta por lo tanto capacidad de inhibir la cascada inflamatoria mediada por NFκB ya sea en un contexto de inflamación aguda como crónica.

La melatonina podría ejercer su actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora a través de receptores de membrana MT1 y MT2, ambos asociados a proteínas G, por regla general, inhibidoras (G_i) (Hardeland 2008). No obstante, se ha caracterizado una activación de las quinasas reguladas por señales extracelulares (*extracellular signal-regulated kinases*) ERK 1 y 2 mediada tanto por proteínas G_i como G_s asociadas a MT1 en células renales embrionarias HEK293 (Chen et al. 2014). Así, los mecanismos de señalización intracelular activados son múltiples y difieren entre tipos celulares, siendo aún objeto de investigación (Dubocovich y Markowska 2005).

Al margen de las funciones mediadas por receptores, la melatonina presenta *per se* capacidad antioxidante. Puesto que los radicales libres son por sí mismos activadores de la cascada inflamatoria, la melatonina también podría ejercer sus efectos antiinflamatorios a través de la reducción de los radicales libres circundantes. Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral avalan la capacidad antioxidante de la melatonina en pulmón, pues su administración fue capaz de reducir la expresión proteica y de mRNA de HO-1 (como ya hemos visto, marcador sensible de estrés oxidativo), así como el contenido de 8-hidroxiguanosina en pulmón de ratón SAMP8, revirtiendo la elevación de estos parámetros secundaria al envejecimiento. Los estudios realizados sobre neumocitos tipo II en machos de ratas Wistar también avalan un papel antioxidante de la melatonina, habiéndose observado un incremento en los niveles de LPO en este tipo celular en ratas viejas respecto a jóvenes, que fue revertido por la administración de melatonina. Investigaciones previas han hallado también una reducción en la expresión de HO-1

a cargo de la administración de melatonina en otros órganos en el contexto de inflamación crónica relacionada con el envejecimiento (Cuesta et al. 2010; Cuesta et al. 2011), pero también en el contexto de inflamación aguda en un modelo animal de sepsis (Li Volti et al. 2012). La reducción que hemos observado en la cantidad de CO, metabolito producido principalmente por la HO, en neumocitos tipo II de ratas viejas tratadas con melatonina también apunta a una posible inhibición en la expresión de la HO-1.

Además de antioxidante directo, investigaciones previas que muestran la capacidad de la melatonina para inhibir la expresión de la iNOS tanto en inflamación crónica asociada al envejecimiento (Cuesta et al. 2010; Cuesta et al. 2011) como aguda secundaria a endotoxemia (Crespo et al. 1999; García et al. 2017) apuntan a una reducción indirecta del estrés oxidativo al inhibir la producción masiva de NO. Nuestros resultados muestran una tendencia a la inhibición de la iNOS tras la administración de melatonina, aunque sin alcanzar la significación estadística. No obstante, sí se hallaron diferencias significativas en los experimentos con neumocitos tipo II en las concentraciones de NO de ratas tratadas con melatonina a la dosis de 5 mg/kg/día, así como de cGMP, su segundo mensajero, a ambas dosis, aunque con mayor eficacia con la de 5 mg/kg/día, por lo que no puede descartarse la implicación de la melatonina en la inhibición de la iNOS.

Además de los efectos antiinflamatorios y antioxidantes sobre el envejecimiento pulmonar vistos en esta tesis doctoral, nuestros resultados también han mostrado un efecto antiapoptótico de la administración de melatonina en el modelo SAMP8, habiéndose descrito una reducción en la expresión de BAD, BAX y AIF, sin modificaciones sobre los niveles de mRNA de la molécula antiapoptótica Bcl-2. La relación entre melatonina y apoptosis es compleja, pues por regla general se ha observado una capacidad antiapoptótica en células normales y proapoptótica en cancerígenas (Majidinia et al. 2018). Tradicionalmente se han atribuido sus efectos

antiapoptóticos a su acción como barredor de radicales libres: al reducir el estrés oxidativo celular, la melatonina reduciría los estímulos desencadenantes de la apoptosis. No obstante, se han observado también acciones antiapoptóticas mediadas por los receptores (Das et al. 2010). Además, estudios sobre células tumorales muestran actividad proapoptótica a través de un incremento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial mediante la implicación de los receptores MT1 y MT2 (Lanoix et al. 2012).

Hasta donde sabemos son pocos los estudios que han investigado los potenciales efectos protectores de la melatonina sobre el surfactante pulmonar. Así, la melatonina se ha mostrado eficaz a la hora de reducir los niveles de LPO del surfactante pulmonar inducida por leucocitos polimorfonucleares activados (Bouhafs y Jarstrand 2002). Nuestros resultados, como ya hemos visto, sugieren una reducción en la capacidad de síntesis de PC secundaria al envejecimiento. La administración de melatonina fue capaz de restaurar esta actividad, siendo más eficaz a la dosis de 5 mg/kg/día que a la de 2,5 mg/kg/día. Presumiblemente, este efecto podría relacionarse con la actividad citoprotectora de la melatonina secundaria a su actividad antioxidante y antiinflamatoria.

Al igual que con la administración de melatonina, los resultados presentados en esta tesis doctoral avalan la acción antiinflamatoria y antioxidante del xantohumol. El xantohumol a ambas dosis testadas ha sido capaz de contrarrestar la elevación secundaria al envejecimiento de las citoquinas proinflamatorias TNF α e IL-1 β , siendo más efectiva para la reducción de esta última la dosis de 5 mg/kg/día que la de 1 mg/kg/día. No se han encontrado cambios en la expresión de NF κ B1 en pulmón con la administración de xantohumol, pero este factor de transcripción tampoco se vio elevado en pulmón con la edad. Este no fue el caso para NF κ B2, para el cual se vieron niveles de mRNA elevados en ratones SAMP8 viejos, efecto que fue contrarrestado en los grupos tratados con xantohumol. Al igual que con la administración de melatonina, el tratamiento

con xantohumol no fue capaz de antagonizar de forma significativa la elevación secundaria al envejecimiento en los niveles de mRNA de NKAP, aunque sí se observó una tendencia a su reducción. Otras investigaciones de nuestro grupo sobre envejecimiento cerebral (Rancán et al. 2017) y hepático (Fernández-García et al. 2019) han mostrado resultados similares, de manera que la administración de xantohumol a 5 mg/kg/día fue más eficaz que la dosis de 1 mg/kg/día a la hora de reducir la expresión de TNF α e IL-1 β en cerebro y en hígado; siendo la dosis de 5 mg/kg/día la única capaz de contrarrestar la elevación asociada al envejecimiento de NF κ B2 y de NF κ B subunidad p65. De forma similar, resultados previos en corazón muestran eficacia en la dosis de 5 mg/kg/día de xantohumol (pero no en la de 1 mg/kg/día) para contrarrestar la elevación de IL-1 β , aunque, en este caso, no se observaron diferencias entre ambas dosis para revertir el aumento de TNF α ni de NF κ B subunidad p65 (Campillo et al. 2018). Pocas investigaciones han descrito los efectos antiinflamatorios del xantohumol en tejido pulmonar. Un estudio *in vivo* sobre cerdos infectados con el virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino observó una reducción con la administración de xantohumol en los niveles de TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 en pulmón (Liu et al. 2019), datos en consonancia con los resultados presentados en esta tesis doctoral.

La capacidad antiinflamatoria del xantohumol ha sido investigada en otros órganos en el contexto de la inflamación aguda. Así, el xantohumol, a dosis intraperitoneales de entre 12,5 y 50 mg/kg/día, ha atenuado la nefrotoxicidad inducida por cisplatino en ratones, contrarrestando en forma dependiente de dosis la elevación de los niveles de los mediadores proinflamatorios TNF α , IL-1 β , IL-6 e NF κ B (Li et al. 2018). Este modelo mostró también un aumento en la expresión de HO-1 secundaria al cisplatino que fue exacerbada por la administración de xantohumol. La elevación de HO-1 se vio acompañada de la del factor 2 asociado al factor nuclear eritroide 2 (*nuclear factor erythroid 2–related factor 2*) Nrf2, molécula implicada en la activación de varios sistemas antioxidantes, entre ellos, SOD, GPx y HO-1 (Ma 2013). Estos resultados son consistentes

con otras investigaciones que muestran *in vitro* en microglía de ratón un descenso en los niveles de TNF α , IL-1 β , IL-6 y NF κ B inducidos por LPS, que fue acompañado de incremento de Nrf2 y de HO-1 (Lee et al. 2011). Estos hallazgos contrastan con nuestros resultados, en los que la edad se acompaña de un incremento en la expresión proteica y de mRNA de HO-1 que fue neutralizado por la administración de xanthohumol. Este fenómeno se vio también previamente por nuestro grupo en los niveles de mRNA de HO-1 en hígado de ratones SAMP8 viejos, siendo el tratamiento con 5 mg/kg/día de xanthohumol capaz de reducir de nuevo la transcripción de HO-1 (Fernández-García et al. 2019). Estas diferencias podrían deberse a los diferentes contextos estudiados: mientras que los estudios que encuentran un incremento en la expresión de HO-1 (relacionada con Nrf2) son modelos de inflamación aguda con tratamientos cortos, los resultados que atribuyen al xanthohumol una inhibición de HO-1 proceden de tratamientos crónicos en el contexto de envejecimiento. La administración crónica de xanthohumol podría inducir un entorno con menor estrés oxidativo y por tanto reducir a largo plazo la expresión de HO-1. Estudios futuros que incluyan la medición de Nrf2 en el contexto de xanthohumol e inflamación crónica podrían arrojar luz sobre este fenómeno.

Los estudios aquí presentados han hallado un aumento significativo en la expresión de mRNA de iNOS en los ratones SAMP8 viejos en comparación con los jóvenes. No obstante, ni la administración de melatonina ni de xanthohumol indujo diferencias significativas. Estudios previos en nuestro grupo sobre hígado hallaron una tendencia a reducir los niveles de iNOS con la administración de xanthohumol en el mismo contexto, sin alcanzar la significación estadística. El xanthohumol ha sido capaz de contrarrestar *in vitro* la sobreproducción de NO secundaria a exposición a LPS (Zhao et al. 2003; Lee et al. 2011), viéndose implicada una reducción en la expresión de iNOS (Zhao et al. 2003). Por tanto, no puede descartarse la disminución en los niveles de iNOS dentro de las acciones antiinflamatorias y antioxidantes del xanthohumol.

Cabe destacar que los efectos de la administración de las sustancias antioxidantes melatonina y xantohumol sobre la inflamación crónica, el estrés oxidativo y el entorno proapoptótico vistos en el envejecimiento podrían ser dosis dependientes. Así, los resultados de la presente tesis doctoral muestran que la administración de melatonina en ratones SAMP8 a la dosis de 1 mg/kg/día ha sido suficiente para revertir la mayoría de las alteraciones secundarias al envejecimiento, sin encontrarse diferencias con la administración de 10 mg/kg/día. No obstante, las mediciones sobre neumocitos tipo II han mostrado una mayor eficacia de la dosis de 5 mg/kg/día que la de 2,5 mg/kg/día en la restauración de los niveles de PC, NO, CO y cGMP. Las dosis de melatonina administradas varían en los diversos estudios previos. La mayoría de los estudios relacionados con inflamación de bajo grado/crónica (como es el caso de las investigaciones de nuestro grupo) han administrado dosis de entre 1 y 10 mg/kg/día en ratas o ratones, mientras que los estudios sobre inflamación aguda han administrado entre 10 y 30 mg/kg cada 6 h en dosis aisladas antes y después de la inducción de la sepsis (Paskaloğlu et al. 2004; Şener et al. 2004), o bien a lo largo de las primeras 24 h tras la inducción de la sepsis (Zhang et al. 2013). En el momento actual se está llevando a cabo un ensayo clínico aleatorizado que estudiará los efectos de la administración intravenosa de melatonina a dosis de 5 mg/kg cada 6 horas en pacientes intubados con neumonía COVID-19 (Rodríguez-Rubio et al. 2020). A tenor de nuestros resultados, en el contexto de la inflamación de bajo grado asociada al envejecimiento, serían suficientes dosis de entre 1 y 5 mg/kg/día. Debemos tener en cuenta que las concentraciones fisiológicas de melatonina, que se encuentran reducidas en la población anciana, son del orden nanomolar, mientras que las concentraciones en las que se ha detectado actividad antiinflamatoria se encuentran en el orden nanomolar, micromolar o incluso milimolar (Hardeland 2018).

En cuanto al xantohumol, los resultados aquí presentados apenas han mostrado diferencias entre la dosis de 1 mg/kg/día y 5 mg/kg/día, habiéndose encontrado mayor eficacia

en la dosis más alta únicamente en la reducción de los niveles de IL-1 β y de HO-1. No obstante, investigaciones previas de nuestro grupo en cerebro, hígado y corazón sí que han hallado por regla general mayor eficacia del xantohumol a 5 mg/kg/día en la reversión de las alteraciones inducidas por el envejecimiento (Rancán et al. 2017; Campillo et al. 2018; Fernández-García et al. 2019). Los datos sobre otros estudios *in vivo* son escasos, habiéndose descrito la administración intranasal o intramuscular de xantohumol a 10, 20 y 25 mg/kg cada 72 h durante 14 días en cerdos (Liu et al. 2019) o bien entre 12,5 y 50 mg/kg/día intraperitoneales durante 3 días en ratones (Li et al. 2018), en el contexto de la inflamación aguda. Según nuestros resultados, las dosis necesarias para el tratamiento de la inflamación de bajo grado asociada al envejecimiento son menores que las estudiadas en los contextos de inflamación aguda.

El climaterio constituye una situación particular de envejecimiento, en el que los fenómenos de inflamación, estrés oxidativo y apoptosis se ven acompañados por un déficit estrogénico. La marcada reducción en los niveles de estrógenos tras la menopausia se ha asociado a un incremento del estrés oxidativo. Las concentraciones serológicas de citoquinas inflamatorias y de biomarcadores prooxidantes como el 4-hidroxienal y el malondialdehído son superiores en mujeres postmenopáusicas que en premenopáusicas (Signorelli et al. 2006), sugiriendo un alto grado de estrés oxidativo durante la menopausia (McLean 2009; Holguin 2013). En los resultados presentados en esta tesis doctoral hemos observado un aumento relacionado con la edad en los marcadores de estrés oxidativo CO, NO, cGMP y LPO, así como una inhibición de los sistemas antioxidantes enzimáticos CAT, GPx y GR, en neumocitos tipo II de ratas Wistar. Estos cambios se vieron exacerbados en ratas macho y en ratas hembra ooforectomizadas. Además, fueron parcialmente revertidos por el tratamiento con 17- β -estradiol y con fitoestrógenos, dato que apoya la asociación entre la supresión estrogénica y un aumento del estrés oxidativo. Estudios previos de nuestro grupo sobre hepatocitos en ratas Wistar ooforectomizadas también mostraron un incremento con la edad y con la supresión estrogénica

en marcadores de estrés oxidativo (iNOS, HO-1, NO y LPO) y en citoquinas proinflamatorias (IL-6, TNF α e IL-1 β), así como una inhibición de la GPx, efectos que se vieron revertidos con la administración de estradiol y de extracto de soja (Kireev et al. 2007; Kireev et al. 2010).

Nuestros resultados muestran que este entorno prooxidante y proinflamatorio asociado a la supresión estrogénica se ha visto acompañado por una disminución en la síntesis *de novo* de PC, el principal componente del surfactante pulmonar. Las concentraciones intracelulares elevadas de cGMP son inhibidores conocidos de la síntesis de surfactante en neumocitos tipo II (Vara et al. 1995), y la producción de cGMP es inducida por la generación endógena de CO y de NO (Furchgott y Jothianandan 1991). Se ha observado previamente que el CO contribuye a la inhibición de la síntesis de surfactante inducida por citoquinas en neumocitos tipo II humanos (Arias-Díaz et al. 1997). Tanto la actividad de la HO (Coburn et al. 1967) y la LPO (Wolff 1976) son fuentes de CO. Nuestros resultados sugieren una activación de esta vía a cargo de la supresión estrogénica y el envejecimiento, disminuyendo la capacidad de síntesis de surfactante pulmonar (como hemos visto, no puede concluirse de este dato una reducción en la cantidad o calidad del surfactante pulmonar). También hemos observado que la reposición estrogénica mejora significativamente estas condiciones que afectan a la síntesis de surfactante.

Los mecanismos por los cuales el estradiol y los fitoestrógenos protegen la producción de surfactante y el estatus redox de los neumocitos tipo II podrían ser múltiples. El pulmón expresa dos tipos de receptores estrogénicos: ER- α y ER- β . Ambos tipos de receptores son necesarios para la formación de unidades alveolares completas en hembras. Las acciones mediadas por los ER- α promueven una correcta diferenciación pulmonar durante el desarrollo, conduciendo a un número normal de alveolos por unidad de superficie. Por el contrario, los ER- β están implicados en la modulación del desarrollo de la matriz extracelular, conduciendo a una correcta capacidad de retracción elástica pulmonar (Massaro y Massaro 2004; Massaro y Massaro 2006). Los ER- β

parecen ser los receptores estrogénicos predominantes en el pulmón postnatal (Patrone et al. 2003). De hecho, su activación en neumocitos tipo II se relaciona con la síntesis de la proteína de surfactante Sftpb (Zscheppang et al. 2011), no pudiéndose descartar su implicación en la síntesis de PC. No obstante, los pulmones envejecidos y sometidos a supresión estrogénica muestran un marcado aumento en el número de receptores ER- α , pero no de receptores ER- β , fenómeno que es revertido por la administración de estradiol (Glassberg et al. 2014). Además, se ha demostrado que los ER- α están implicados en una respuesta antiinflamatoria en células del sistema inmune y endoteliales (Vegeto et al. 2010). Este fenómeno podría estar mediado por la inhibición de la traslocación del factor NF κ B, impidiendo por tanto la expresión de genes proinflamatorios (Ghisletti et al. 2005), promoviendo un entorno más favorable para los neumocitos tipo II. Por tanto, la interacción entre el 17- β -estradiol y los receptores ER- α y ER- β , tanto en neumocitos tipo II como en otras células residentes del pulmón (endoteliales e inmunitarias), podría estar implicada en los resultados aquí presentados. Se necesitan estudios sobre los mecanismos involucrados para dilucidar las vías moleculares implicadas en la protección de la capacidad de síntesis de surfactante y en la reducción del estrés oxidativo en el envejecimiento pulmonar.

Por otro lado, los fitoestrógenos se unen preferentemente a los ER- β (Mueller et al. 2004), pero también muestran efectos no mediados por receptores estrogénicos (Ganai y Farooqi 2015; Zafar et al. 2016). En la presente tesis doctoral hemos administrado un extracto que contiene isoflavonas derivadas de la soja, principalmente genisteína y daidzeína. La genisteína ejerce otras acciones moleculares además del agonismo sobre los ER- β y, en menor medida, sobre los ER- α . En primer lugar, actúa como barredor de radicales libres al donar un hidrogenión desde sus grupos hidroxifenólicos (Ganai y Farooqi 2015). Además, puede unirse a otras moléculas diana, como el factor inducible por hipoxia (*hipoxia induced factor*) HIF-1 α (Mukund et al. 2019) o la topoisomerasa II (Markovits et al. 1989). Así, ha demostrado propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas, incluyendo la reducción de la producción de NO por parte

de iNOS (Zaslaver et al. 2005), de LPO y de la amplificación de la respuesta inflamatoria local (Valsecchi et al. 2011).

La daidzeína es metabolizada a la isoflavona equol por la microbiota intestinal de manera inconsistente (Franke et al. 2014). Por tanto, sus acciones pueden atribuirse al menos parcialmente al equol. Además de su interacción con los ER- β , la daidzeína ha mostrado actividad antioxidante directa contra la LPO (Dwiecki et al. 2009). Por su parte, el equol es un potente barredor de radicales libres que ha demostrado reducir *in vivo* la producción de NO por parte de la iNOS en macrófagos murinos (Kang et al. 2007). Por tanto, son muchos los mecanismos potenciales que podrían explicar los efectos de la suplementación con fitoestrógenos sobre la síntesis de PC, la LPO y la disfunción en sistemas antioxidantes enzimáticos. Además, hallazgos previos en hepatocitos sugieren que los efectos protectores de las isoflavonas podrían no ser específicos para cada órgano (Kireev et al. 2010).

6. Conclusiones

1. El envejecimiento condujo a un incremento en mediadores proinflamatorios (TNF α , IL-1 β , NF κ B2, NF κ B subunidad 50, NF κ B subunidad p65 y NKAP), marcadores de estrés oxidativo (HO-1, 8-OHG e iNOS) y mediadores proapoptóticos (BAD, BAX y AIF) en pulmón de ratón SAMP8 respecto a ratones jóvenes de su misma cepa.
2. Los ratones SAMR1 viejos no mostraron diferencias respecto a los jóvenes de su misma cepa y mostraron, en general, valores más bajos de dichos parámetros que los ratones SAMP8.
3. La administración de melatonina consiguió revertir la mayoría de las alteraciones asociadas al envejecimiento, reduciendo los niveles de TNF α , IL-1 β , NF κ B2, NF κ B subunidad 50, NF κ B subunidad p65, HO-1, 8-OHG, BAD, BAX y AIF en ratones SAMP8 viejos respecto a ratones SAMP8 viejos no tratados.
4. La administración de xanthumol también consiguió revertir la mayoría de las alteraciones asociadas al envejecimiento, reduciendo los niveles de TNF α , IL-1 β , NF κ B2 y HO-1 en ratones SAMP8 viejos respecto a ratones SAMP8 viejos no tratados.
5. El envejecimiento se asoció a un incremento de los marcadores de estrés oxidativo CO, NO, cGMP y LPO en neumocitos tipo II de ratas Wistar, tanto machos como hembras y hembras ooforectomizadas. Se observó también una reducción con la edad en la capacidad de síntesis de PC y en la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, GR y GPx. Estos cambios fueron más marcados en ratas macho y en hembras ooforectomizadas.
6. La administración de melatonina consiguió reducir los niveles de CO, NO, cGMP y LPO en neumocitos tipo II de ratas macho viejas respecto a ratas macho viejas no tratadas. También incrementó la capacidad de síntesis de PC respecto al grupo sin tratamiento.
7. La administración de 17- β -estradiol y de extracto de soja consiguió reducir los niveles de CO, NO, cGMP y LPO en neumocitos tipo II de ratas hembra viejas ooforectomizadas respecto a viejas ooforectomizadas no tratadas. También incrementó la capacidad de

síntesis de PC y la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, GR y GPx respecto al grupo sin tratamiento.

En conclusión, la administración de melatonina y xantohumol podría tener efectos beneficiosos sobre las alteraciones proinflamatorias, prooxidantes y, en el caso de la melatonina, proapoptóticas inducidas por el envejecimiento pulmonar. Además, la supresión estrogénica conduce a alteraciones en el estatus redox pulmonar que pueden ser revertidas con la administración de estradiol y de isoflavonas derivadas de la soja.

8. Bibliografía

- Acuña-Castroviejo D, Carretero M, Doerrier C, López LC, García-Corzo L, Tresguerres JA, Escames G. 2012. Melatonin protects lung mitochondria from aging. *AGE*. 34(3):681–692. doi:10.1007/s11357-011-9267-8.
- Adler AS, Sinha S, Kawahara TLA, Zhang JY, Segal E, Chang HY. 2007. Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF- κ B activity. *Genes & Development*. 21(24):3244–3257. doi:10.1101/gad.1588507.
- Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. 2018. Ficha Técnica Melatonina Generic Partners 2 mg. https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/84967/FT_84967.pdf.
- Ali T, Badshah H, Kim TH, Kim MO. 2015. Melatonin attenuates D-galactose-induced memory impairment, neuroinflammation and neurodegeneration via RAGE/NF- κ B/JNK signaling pathway in aging mouse model. *J Pineal Res*. 58(1):71–85. doi:10.1111/jpi.12194.
- Andersen LPH, Werner MU, Rosenkilde MM, Harpsøe NG, Fuglsang H, Rosenberg J, Gögenur I. 2016. Pharmacokinetics of oral and intravenous melatonin in healthy volunteers. *BMC Pharmacol Toxicol*. 17:8. doi:10.1186/s40360-016-0052-2.
- Araujo JA, Zhang M, Yin F. 2012. Heme Oxygenase-1, Oxidation, Inflammation, and Atherosclerosis. *Front Pharmacol*. 3. doi:10.3389/fphar.2012.00119. [accessed 2020 Jul 19]. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2012.00119/abstract>.
- Arias-Díaz J, Villa N, Hernández J, Vara E, Balibrea JL. 1997. Carbon monoxide contributes to the cytokine-induced inhibition of surfactant synthesis by human type II pneumocytes. *Arch Surg*. 132(12):1352–1360; discussion 1360-1361.
- Asano K, Chee CB, Gaston B, Lilly CM, Gerard C, Drazen JM, Stamler JS. 1994. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91(21):10089–10093. doi:10.1073/pnas.91.21.10089.
- Austad SN, Hoffman JM. 2018. Is antagonistic pleiotropy ubiquitous in aging biology? *Evolution, Medicine, and Public Health*. 2018(1):287–294. doi:10.1093/emph/eoy033.
- Badesch DB, Raskob GE, Elliott CG, Krichman AM, Farber HW, Frost AE, Barst RJ, Benza RL, Liou TG, Turner M, et al. 2010. Pulmonary arterial hypertension: baseline characteristics from the REVEAL Registry. *Chest*. 137(2):376–387. doi:10.1378/chest.09-1140.
- Bae J-M, Kim EH. 2015. Hormonal Replacement Therapy and the Risk of Lung Cancer in Women: An Adaptive Meta-analysis of Cohort Studies. *J Prev Med Public Health*. 48(6):280–286. doi:10.3961/jpmph.15.054.
- Baker DJ, Hepple RT. 2006. Elevated caspase and AIF gene expression correlate with progression of sarcopenia during aging in male F344BN rats. *Exp Gerontol*. 41(11):1149–1156. doi:10.1016/j.exger.2006.08.007.
- Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G. 1987. Aspects of the Structure, Function, and Applications of Superoxide Dismutase. *Critical Reviews in Biochemistry*. 22(2):111–180. doi:10.3109/10409238709083738.

- Baylis D, Bartlett DB, Patel HP, Roberts HC. 2013. Understanding how we age: insights into inflammaging. *Longev Healthspan*. 2(1):8. doi:10.1186/2046-2395-2-8.
- Beckman JS, Koppenol WH. 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 271(5):C1424–C1437. doi:10.1152/ajpcell.1996.271.5.C1424.
- Bime C, Wei CY, Holbrook J, Smith LJ, Wise RA. 2011. Dietary Intake Of Soy Genistein Is Associated With Asthma Control And Lung Function In Asthma Patients. In: C33. CLINICAL PROFILES AND SEVERITY OF ASTHMA. American Thoracic Society. p. A4327–A4327. [accessed 2019 Aug 18]. http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm-conference.2011.183.1_MeetingAbstracts.A4327.
- Bjorksten J. 1968. THE CROSSLINKAGE THEORY OF AGING. *Journal of the American Geriatrics Society*. 16(4):408–427. doi:10.1111/j.1532-5415.1968.tb02821.x.
- Botta B, Vitali A, Menendez P, Misiti D, Monache G. 2005. Prenylated Flavonoids: Pharmacology and Biotechnology. *CMC*. 12(6):713–739. doi:10.2174/0929867053202241.
- Bouhafs RKL, Jarstrand C. 2002. Effects of antioxidants on surfactant peroxidation by stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Free Radic Res*. 36(7):727–734.
- Bowie A, O'Neill LAJ. 2000. Oxidative stress and nuclear factor- κ B activation. *Biochemical Pharmacology*. 59(1):13–23. doi:10.1016/S0006-2952(99)00296-8.
- Brass DM, McGee SP, Dunkel MK, Reilly SM, Tobolewski JM, Sabo-Attwood T, Fattman CL. 2010. Gender influences the response to experimental silica-induced lung fibrosis in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 299(5):L664–671. doi:10.1152/ajplung.00389.2009.
- Butterfield DA, Poon HF. 2005. The senescence-accelerated prone mouse (SAMP8): a model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*. 40(10):774–783. doi:10.1016/j.exger.2005.05.007.
- Campillo S, Rancan L, Paredes SD, Higuera M, Izquierdo A, García C, Forman K, Tresguerres JAF, Vara E. 2018. Effect of treatment with xanthohumol on cardiological alterations secondary to ageing. *Journal of Functional Foods*. 49:44–51. doi:10.1016/j.jff.2018.07.059.
- Canan CH, Gokhale NS, Carruthers B, Lafuse WP, Schlesinger LS, Torrelles JB, Turner J. 2014. Characterization of lung inflammation and its impact on macrophage function in aging. *J Leukoc Biol*. 96(3):473–480. doi:10.1189/jlb.4A0214-093RR.
- Cannizzo ES, Clement CC, Sahu R, Follo C, Santambrogio L. 2011. Oxidative stress, inflamm-aging and immunosenescence. *Journal of Proteomics*. 74(11):2313–2323. doi:10.1016/j.jprot.2011.06.005.
- Chen L, He X, Zhang Y, Chen X, Lai X, Shao J, Shi Y, Zhou N. 2014. Melatonin Receptor Type 1 Signals to Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 and 2 via G_i and G_s Dually Coupled Pathways in HEK-293 Cells. *Biochemistry*. 53(17):2827–2839. doi:10.1021/bi500092e.

Chlebowski RT, Anderson GL. 2012. Changing concepts: Menopausal hormone therapy and breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 104(7):517–527. doi:10.1093/jnci/djs014.

Cho Y-C, Kim HJ, Kim Y-J, Lee KY, Choi HJ, Lee I-S, Kang BY. 2008. Differential anti-inflammatory pathway by xanthohumol in IFN- γ and LPS-activated macrophages. *International Immunopharmacology.* 8(4):567–573. doi:10.1016/j.intimp.2007.12.017.

Choi IS. 2011. Gender-specific asthma treatment. *Allergy Asthma Immunol Res.* 3(2):74–80. doi:10.4168/aair.2011.3.2.74.

Christmann U, Hite RD, Witonsky SG, Elvinger F, Werre SR, Thatcher CD, Tan RHH, Buechner-Maxwell VA. 2009. Influence of Age on Surfactant Isolated from Healthy Horses Maintained on Pasture. *Journal of Veterinary Internal Medicine.* 23(3):612–618. doi:10.1111/j.1939-1676.2009.0298.x.

Chung HY, Sung B, Jung KJ, Zou Y, Yu BP. 2006. The Molecular Inflammatory Process in Aging. *Antioxidants & Redox Signaling.* 8(3–4):572–581. doi:10.1089/ars.2006.8.572.

Coburn RF, Williams WJ, White P, Kahn SB. 1967. The production of carbon monoxide from hemoglobin in vivo. *J Clin Invest.* 46(3):346–356. doi:10.1172/JCI105536.

Colgate EC, Miranda CL, Stevens JF, Bray TM, Ho E. 2007. Xanthohumol, a prenylflavonoid derived from hops induces apoptosis and inhibits NF-kappaB activation in prostate epithelial cells. *Cancer Lett.* 246(1–2):201–209. doi:10.1016/j.canlet.2006.02.015.

Crespo E, Macías M, Pozo D, Escames G, Martín M, Vives F, Guerrero JM, Acuña-Castroviejo D. 1999. Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *FASEB J.* 13(12):1537–1546.

Cuesta S, Kireev R, Forman K, García C, Escames G, Ariznavarreta C, Vara E, Tresguerres JAF. 2010. Melatonin improves inflammation processes in liver of senescence-accelerated prone male mice (SAMP8). *Experimental Gerontology.* 45(12):950–956. doi:10.1016/j.exger.2010.08.016.

Cuesta S, Kireev R, García C, Forman K, Escames G, Vara E, Tresguerres JAF. 2011. Beneficial effect of melatonin treatment on inflammation, apoptosis and oxidative stress on pancreas of a senescence accelerated mice model. *Mechanisms of Ageing and Development.* 132(11–12):573–582. doi:10.1016/j.mad.2011.10.005.

Cuesta S, Kireev R, García C, Rancan L, Vara E, Tresguerres JAF. 2013. Melatonin can improve insulin resistance and aging-induced pancreas alterations in senescence-accelerated prone male mice (SAMP8). *Age (Dordr).* 35(3):659–671. doi:10.1007/s11357-012-9397-7.

Das A, McDowell M, Pava MJ, Smith JA, Reiter RJ, Woodward JJ, Varma AK, Ray SK, Banik NL. 2010. The inhibition of apoptosis by melatonin in VSC4.1 motoneurons exposed to oxidative stress, glutamate excitotoxicity, or TNF- α toxicity involves membrane melatonin receptors. *Journal of Pineal Research.* 48(2):157–169. doi:10.1111/j.1600-079X.2009.00739.x.

Deng W-G, Tang S-T, Tseng H-P, Wu KK. 2006. Melatonin suppresses macrophage cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting p52 acetylation and binding. *Blood.* 108(2):518–524. doi:10.1182/blood-2005-09-3691.

- Dijsselbloem N, Vanden Berghe W, De Naeyer A, Haegeman G. 2004. Soy isoflavone phyto-pharmaceuticals in interleukin-6 affections. Multi-purpose nutraceuticals at the crossroad of hormone replacement, anti-cancer and anti-inflammatory therapy. *Biochem Pharmacol*. 68(6):1171–1185. doi:10.1016/j.bcp.2004.05.036.
- Dubocovich ML, Markowska M. 2005. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*. 27(2):101–110. doi:10.1385/ENDO:27:2:101.
- Dwiecki K, Neunert G, Polewski P, Polewski K. 2009. Antioxidant activity of daidzein, a natural antioxidant, and its spectroscopic properties in organic solvents and phosphatidylcholine liposomes. *J Photochem Photobiol B, Biol*. 96(3):242–248. doi:10.1016/j.jphotobiol.2009.06.012.
- Fernández-García C, Rancan L, Paredes SD, Montero C, de la Fuente M, Vara E, Tresguerres JAF. 2019. Xanthohumol exerts protective effects in liver alterations associated with aging. *Eur J Nutr*. 58(2):653–663. doi:10.1007/s00394-018-1657-6.
- Forman K, Vara E, García C, Kireev R, Cuesta S, Acuña-Castroviejo D, Tresguerres JAF. 2010. Beneficial effects of melatonin on cardiological alterations in a murine model of accelerated aging: Melatonin effects on heart. *Journal of Pineal Research*. 49(3):312–320. doi:10.1111/j.1600-079X.2010.00800.x.
- Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G. 2000. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci*. 908:244–254.
- Franke AA, Lai JF, Halm BM. 2014. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of isoflavonoids after soy intake. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 559:24–28. doi:10.1016/j.abb.2014.06.007.
- Fridovich I. 1978. The biology of oxygen radicals. *Science*. 201(4359):875–880. doi:10.1126/science.210504.
- Furchgott RF, Jothianandan D. 1991. Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels*. 28(1–3):52–61. doi:10.1159/000158843.
- Gan WQ, Man SFP, Postma DS, Camp P, Sin DD. 2006. Female smokers beyond the perimenopausal period are at increased risk of chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. *Respir Res*. 7:52. doi:10.1186/1465-9921-7-52.
- Ganai AA, Farooqi H. 2015. Bioactivity of genistein: A review of in vitro and in vivo studies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 76:30–38. doi:10.1016/j.biopha.2015.10.026.
- García JA, Ortiz F, Miana J, Doerrier C, Fernández-Ortiz M, Rusanova I, Escames G, García JJ, Acuña-Castroviejo D. 2017. Contribution of inducible and neuronal nitric oxide synthases to mitochondrial damage and melatonin rescue in LPS-treated mice. *J Physiol Biochem*. 73(2):235–244. doi:10.1007/s13105-017-0548-2.
- Gerhauser C, Alt A, Heiss E, Gamal-Eldeen A, Klimo K, Knauff J, Neumann I, Scherf H-R, Frank N, Bartsch H, et al. 2002. Cancer chemopreventive activity of Xanthohumol, a natural product derived from hop. *Mol Cancer Ther*. 1(11):959–969.

- Ghisletti S, Meda C, Maggi A, Vegeto E. 2005. 17 β -estradiol inhibits inflammatory gene expression by controlling NF-kappaB intracellular localization. *Mol Cell Biol.* 25(8):2957–2968. doi:10.1128/MCB.25.8.2957-2968.2005.
- Ginés C, Cuesta S, Kireev R, García C, Rancan L, Paredes SD, Vara E, Tresguerres JAF. 2017. Protective effect of resveratrol against inflammation, oxidative stress and apoptosis in pancreas of aged SAMP8 mice. *Experimental Gerontology.* 90:61–70. doi:10.1016/j.exger.2017.01.021.
- Glassberg MK, Choi R, Manzoli V, Shahzeidi S, Rauschkolb P, Voswinckel R, Aliniaze M, Xia X, Elliot SJ. 2014. 17 β -Estradiol Replacement Reverses Age-Related Lung Disease in Estrogen-Deficient C57BL/6J Mice. *Endocrinology.* 155(2):441–448. doi:10.1210/en.2013-1345.
- Goto M, Katayama K-I, Shirakawa F, Tanaka I. 1999. INVOLVEMENT OF NF-kB p50/p65 HETERODIMER IN ACTIVATION OF THE HUMAN PRO-INTERLEUKIN-1 β GENE AT TWO SUBREGIONS OF THE UPSTREAM ENHANCER ELEMENT. *Cytokine.* 11(1):16–28. doi:10.1006/cyto.1998.0390.
- Günther A, Siebert C, Schmidt R, Ziegler S, Grimminger F, Yabut M, Temmesfeld B, Walmrath D, Morr H, Seeger W. 1996. Surfactant alterations in severe pneumonia, acute respiratory distress syndrome, and cardiogenic lung edema. *Am J Respir Crit Care Med.* 153(1):176–184. doi:10.1164/ajrccm.153.1.8542113.
- Gutierrez HH, Pitt BR, Schwarz M, Watkins SC, Lowenstein C, Caniggia I, Chumley P, Freeman BA. 1995. Pulmonary alveolar epithelial inducible NO synthase gene expression: regulation by inflammatory mediators. *Am J Physiol.* 268(3 Pt 1):L501-508. doi:10.1152/ajplung.1995.268.3.L501.
- Hangen E, Blomgren K, Bénit P, Kroemer G, Modjtahedi N. 2010. Life with or without AIF. *Trends in Biochemical Sciences.* 35(5):278–287. doi:10.1016/j.tibs.2009.12.008.
- Hangen E, Féraud O, Lachkar S, Mou H, Doti N, Fimia GM, Lam N, Zhu C, Godin I, Muller K, et al. 2015. Interaction between AIF and CHCHD4 Regulates Respiratory Chain Biogenesis. *Molecular Cell.* 58(6):1001–1014. doi:10.1016/j.molcel.2015.04.020.
- Hardeland R. 2008. Melatonin, hormone of darkness and more – occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol Life Sci.* 65(13):2001–2018. doi:10.1007/s00018-008-8001-x.
- Hardeland R. 2018. Melatonin and inflammation-Story of a double-edged blade. *J Pineal Res.* 65(4):e12525. doi:10.1111/jpi.12525.
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW. 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.* 345(6274):458–460. doi:10.1038/345458a0.
- Harman. 1991. The aging process: major risk factor for disease and death. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 88(12):5360–5363. doi:10.1073/pnas.88.12.5360.
- Harman. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 11(3):298–300.
- Harman. 1972. The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc.* 20(4):145–147.

- Harman. 2006. Aging: Overview. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 928(1):1–21. doi:10.1111/j.1749-6632.2001.tb05631.x.
- Helenius M. 1996. Aging-induced Up-regulation of Nuclear Binding Activities of Oxidative Stress Responsive NF- κ B Transcription Factor in Mouse Cardiac Muscle. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 28(3):487–498. doi:10.1006/jmcc.1996.0045.
- Hirayama F, Lee AH, Binns CW, Hiramatsu N, Mori M, Nishimura K. 2010. Dietary intake of isoflavones and polyunsaturated fatty acids associated with lung function, breathlessness and the prevalence of chronic obstructive pulmonary disease: possible protective effect of traditional Japanese diet. *Mol Nutr Food Res*. 54(7):909–917. doi:10.1002/mnfr.200900316.
- Holguin F. 2013. Oxidative stress in airway diseases. *Ann Am Thorac Soc*. 10 Suppl:S150-157. doi:10.1513/AnnalsATS.201305-116AW.
- Hosokawa M. 2002. A higher oxidative status accelerates senescence and aggravates age-dependent disorders in SAMP strains of mice. *Mechanisms of Ageing and Development*. 123(12):1553–1561. doi:10.1016/S0047-6374(02)00091-X.
- Huang W. 2005. Mechanisms responsible for surfactant changes in sepsis-induced lung injury. *European Respiratory Journal*. 26(6):1074–1079. doi:10.1183/09031936.05.00085805.
- Ignarro LJ, Napoli C. 2004. Novel features of nitric oxide, endothelial nitric oxide synthase, and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 6(4):281–287. doi:10.1007/s11883-004-0059-9.
- Ishii M, Yamaguchi Y, Yamamoto H, Hanaoka Y, Ouchi Y. 2008. Airspace enlargement with airway cell apoptosis in *klotho* mice: a model of aging lung. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 63(12):1289–1298. doi:10.1093/gerona/63.12.1289.
- Ito Y, Betsuyaku T, Moriyama C, Nasuhara Y, Nishimura M. 2009. Aging affects lipopolysaccharide-induced upregulation of heme oxygenase-1 in the lungs and alveolar macrophages. *Biogerontology*. 10(2):173–180. doi:10.1007/s10522-008-9164-4.
- Javaux EJ. 2019. Challenges in evidencing the earliest traces of life. *Nature*. 572(7770):451–460. doi:10.1038/s41586-019-1436-4.
- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. 2010. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 60(5):277–300. doi:10.3322/caac.20073.
- Jemal A, Ward E, Thun M. 2010. Declining death rates reflect progress against cancer. *PLoS ONE*. 5(3):e9584. doi:10.1371/journal.pone.0009584.
- Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CYJ, Sasaki T, Elia AJ, Cheng H-YM, Ravagnan L, et al. 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*. 410(6828):549–554. doi:10.1038/35069004.
- Kaeberlein M. 2001. Using Yeast to Discover the Fountain of Youth. *Science of Aging Knowledge Environment*. 2001(1):1pe–1. doi:10.1126/sageke.2001.1.pe1.

- Kang JS, Yoon YD, Han MH, Han S-B, Lee K, Park S-K, Kim HM. 2007. Equol inhibits nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase gene expression through down-regulating the activation of Akt. *Int Immunopharmacol.* 7(4):491–499. doi:10.1016/j.intimp.2006.12.004.
- Kayo T, Allison DB, Weindruch R, Prolla TA. 2001. Influences of aging and caloric restriction on the transcriptional profile of skeletal muscle from rhesus monkeys. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 98(9):5093–5098. doi:10.1073/pnas.081061898.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer.* 26(4):239–257. doi:10.1038/bjc.1972.33.
- Kireev RA, Tresguerres ACF, Garcia C, Borrás C, Ariznavarreta C, Vara E, Vina J, Tresguerres J a. F. 2010. Hormonal regulation of pro-inflammatory and lipid peroxidation processes in liver of old ovariectomized female rats. *Biogerontology.* 11(2):229–243. doi:10.1007/s10522-009-9242-2.
- Kireev RA, Tresguerres AF, Vara E, Ariznavarreta C, Tresguerres JAF. 2007. Effect of chronic treatments with GH, melatonin, estrogens, and phytoestrogens on oxidative stress parameters in liver from aged female rats. *Biogerontology.* 8(5):469–482. doi:10.1007/s10522-007-9089-3.
- Kirkwood TBL. 1996. Human senescence. *Bioessays.* 18(12):1009–1016. doi:10.1002/bies.950181211.
- Kovacs E, Lowery E, Kuhlmann E, Brubaker A. 2013 Nov. The aging lung. *CIA.*:1489. doi:10.2147/CIA.S51152.
- Kurokawa T, Ozaki N, Ishibashi S. 1998. Difference between senescence-accelerated prone and resistant mice in response to insulin in the heart. *Mechanisms of Ageing and Development.* 102(1):25–32. doi:10.1016/S0047-6374(98)00009-8.
- Kwon S, Newcomb RL, George SC. 2001. Mechanisms of Synergistic Cytokine-Induced Nitric Oxide Production in Human Alveolar Epithelial Cells. *Nitric Oxide.* 5(6):534–546. doi:10.1006/niox.2001.0387.
- Lanoix D, Lacasse A-A, Reiter RJ, Vaillancourt C. 2012. Melatonin: the smart killer: the human trophoblast as a model. *Mol Cell Endocrinol.* 348(1):1–11. doi:10.1016/j.mce.2011.08.025.
- Lee I-S, Lim J, Gal J, Kang JC, Kim HJ, Kang BY, Choi HJ. 2011. Anti-inflammatory activity of xanthohumol involves heme oxygenase-1 induction via NRF2-ARE signaling in microglial BV2 cells. *Neurochemistry International.* 58(2):153–160. doi:10.1016/j.neuint.2010.11.008.
- Leibowitz A, Peleg E, Sharabi Y, Shabtai Z, Shamiss A, Grossman E. 2008. The Role of Melatonin in the Pathogenesis of Hypertension in Rats With Metabolic Syndrome. *American Journal of Hypertension.* 21(3):348–351. doi:10.1038/ajh.2007.60.
- Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. 1958. ISOLATION OF MELATONIN, THE PINEAL GLAND FACTOR THAT LIGHTENS MELANOCYTES ¹. *J Am Chem Soc.* 80(10):2587–2587. doi:10.1021/ja01543a060.
- Leynaert B, Sunyer J, Garcia-Esteban R, Svanes C, Jarvis D, Cerveri I, Dratva J, Gislason T, Heinrich J, Janson C, et al. 2012. Gender differences in prevalence, diagnosis and incidence of allergic and

non-allergic asthma: a population-based cohort. *Thorax*. 67(7):625–631. doi:10.1136/thoraxjnl-2011-201249.

Li F, Yao Y, Huang H, Hao H, Ying M. 2018. Xanthohumol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity through inhibiting NF- κ B and activating Nrf2 signaling pathways. *International Immunopharmacology*. 61:277–282. doi:10.1016/j.intimp.2018.05.017.

Li Volti G, Musumeci T, Pignatello R, Murabito P, Barbagallo I, Carbone C, Gullo A, Puglisi G. 2012. Antioxidant potential of different melatonin-loaded nanomedicines in an experimental model of sepsis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 237(6):670–677. doi:10.1258/ebm.2012.011425.

Li Z, Li J, Bu X, Liu X, Tankersley CG, Wang C, Huang K. 2011 May. Age-induced augmentation of p38 MAPK phosphorylation in mouse lung. *Experimental Gerontology*.:S0531556511001185. doi:10.1016/j.exger.2011.04.005.

Liu M, Hansen P, Wang G, Qiu L, Dong J, Yin H, Qian Z, Yang M, Miao J. 2015. Pharmacological Profile of Xanthohumol, a Prenylated Flavonoid from Hops (*Humulus lupulus*). *Molecules*. 20(1):754–779. doi:10.3390/molecules20010754.

Liu X, Bai J, Jiang C, Song Z, Zhao Y, Nauwynck H, Jiang P. 2019. Therapeutic effect of Xanthohumol against highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Vet Microbiol*. 238:108431. doi:10.1016/j.vetmic.2019.108431.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 25(4):402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262.

López-Araiza H, Ventura JL, López-Diazguerrero NE, González-Marquez H, Gutiérrez-Ruiz MC, Zentella A, Königsberg M. 2006. Organ- and tissue-specific alterations in the anti-apoptotic protein Bcl-2 in CD1 female mice of different ages. *Biogerontology*. 7(1):63–67. doi:10.1007/s10522-005-6038-x.

Ma Q. 2013. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 53:401–426. doi:10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320.

Maines MD. 1997. THE HEME OXYGENASE SYSTEM:A Regulator of Second Messenger Gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 37(1):517–554. doi:10.1146/annurev.pharmtox.37.1.517.

Majidinia M, Reiter RJ, Shakouri SK, Yousefi B. 2018. The role of melatonin, a multitasking molecule, in retarding the processes of ageing. *Ageing Research Reviews*. 47:198–213. doi:10.1016/j.arr.2018.07.010.

Markovits J, Linassier C, Fossé P, Couprie J, Pierre J, Jacquemin-Sablon A, Saucier JM, Le Pecq JB, Larsen AK. 1989. Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Res*. 49(18):5111–5117.

Massaro D, Massaro GD. 2004. Estrogen regulates pulmonary alveolar formation, loss, and regeneration in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 287(6):L1154–1159. doi:10.1152/ajplung.00228.2004.

- Massaro D, Massaro GD. 2006. Estrogen receptor regulation of pulmonary alveolar dimensions: alveolar sexual dimorphism in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 290(5):L866-870. doi:10.1152/ajplung.00396.2005.
- Matsushita H, Chang E, Glassford AJ, Cooke JP, Chiu C-P, Tsao PS. 2001. eNOS Activity Is Reduced in Senescent Human Endothelial Cells: Preservation by hTERT Immortalization. *Circulation Research*. 89(9):793–798. doi:10.1161/hh2101.098443.
- McLean RR. 2009. Proinflammatory cytokines and osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep*. 7(4):134–139.
- Meister A, Anderson ME. 1983. Glutathione. *Annu Rev Biochem*. 52(1):711–760. doi:10.1146/annurev.bi.52.070183.003431.
- Messina M. 2014. Soy foods, isoflavones, and the health of postmenopausal women. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 100(suppl_1):423S-430S. doi:10.3945/ajcn.113.071464.
- Miranda CL, Stevens JF, Ivanov V, McCall M, Frei B, Deinzer ML, Buhler DR. 2000. Antioxidant and Prooxidant Actions of Prenylated and Nonprenylated Chalcones and Flavanones in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(9):3876–3884. doi:10.1021/jf0002995.
- Moore BB, Hogaboam CM. 2008. Murine models of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 294(2):L152-160. doi:10.1152/ajplung.00313.2007.
- Mori A, Utsumi K, Liu J, Hosokawa M. 1998. Oxidative Damage in the Senescence-accelerated Mouse. *Annals NY Acad Sci*. 854(1 TOWARDS PROLO):239–250. doi:10.1111/j.1749-6632.1998.tb09906.x.
- Morley JE, Armbrecht HJ, Farr SA, Kumar VB. 2012. The senescence accelerated mouse (SAMP8) as a model for oxidative stress and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 1822(5):650–656. doi:10.1016/j.bbadis.2011.11.015.
- Mueller SO, Simon S, Chae K, Metzler M, Korach KS. 2004. Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta in human cells. *Toxicol Sci*. 80(1):14–25. doi:10.1093/toxsci/kfh147.
- Mukund V, Saddala MS, Farran B, Mannavarapu M, Alam A, Nagaraju GP. 2019. Molecular docking studies of angiogenesis target protein HIF-1 α and genistein in breast cancer. *Gene*. 701:169–172. doi:10.1016/j.gene.2019.03.062.
- Orgel LE. 1963. The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 49:517–521. doi:10.1073/pnas.49.4.517.
- Pan L, Becker H, Gerhäuser C. 2005. Xanthohumol induces apoptosis in cultured 40-16 human colon cancer cells by activation of the death receptor- and mitochondrial pathway. *Mol Nutr Food Res*. 49(9):837–843. doi:10.1002/mnfr.200500065.
- Paredes SD, Forman KA, García C, Vara E, Escames G, Tresguerres JAF. 2014. Protective actions of melatonin and growth hormone on the aged cardiovascular system. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 18(2):79–88. doi:10.1515/hmbci-2014-0016.

- Paredes SD, Rancan L, Kireev R, González A, Louzao P, González P, Rodríguez-Bobada C, García C, Vara E, Tresguerres JAF. 2015. Melatonin Counteracts at a Transcriptional Level the Inflammatory and Apoptotic Response Secondary to Ischemic Brain Injury Induced by Middle Cerebral Artery Blockade in Aging Rats. *BioResearch Open Access*. 4(1):407–416. doi:10.1089/biores.2015.0032.
- Paskaloğlu K, Şener G, Kapucu C, Ayanoğlu-Dülger G. 2004. Melatonin treatment protects against sepsis-induced functional and biochemical changes in rat ileum and urinary bladder. *Life Sciences*. 74(9):1093–1104. doi:10.1016/j.lfs.2003.07.038.
- Patrone C, Cassel TN, Pettersson K, Piao Y-S, Cheng G, Ciana P, Maggi A, Warner M, Gustafsson J-A, Nord M. 2003. Regulation of postnatal lung development and homeostasis by estrogen receptor beta. *Mol Cell Biol*. 23(23):8542–8552. doi:10.1128/mcb.23.23.8542-8552.2003.
- Paxson JA, Gruntman A, Parkin CD, Mazan MR, Davis A, Ingenito EP, Hoffman AM. 2011. Age-Dependent Decline in Mouse Lung Regeneration with Loss of Lung Fibroblast Clonogenicity and Increased Myofibroblastic Differentiation. Königshoff M, editor. *PLoS ONE*. 6(8):e23232. doi:10.1371/journal.pone.0023232.
- Peeters ACTM, Netea MG, Janssen MCH, Kullberg BJ, Van der Meer JWM, Thien T. 2001. Pro-inflammatory cytokines in patients with essential hypertension. *Eur J Clin Invest*. 31(1):31–36. doi:10.1046/j.1365-2362.2001.00743.x.
- Peluso M, Miranda C, Hobbs D, Proteau R, Stevens J. 2010. Xanthohumol and Related Prenylated Flavonoids Inhibit Inflammatory Cytokine Production in LPS-Activated THP-1 Monocytes: Structure-Activity Relationships and *In Silico* Binding to Myeloid Differentiation Protein-2 (MD-2). *Planta Med*. 76(14):1536–1543. doi:10.1055/s-0029-1241013.
- Petrucelli G, Verratti V, Antosiewicz J, Cataldi A, Mazzatenta A, Di Giulio C. 2010. Reduced pulmonary function is age-dependent in the rat lung in normoxia. *Eur J Med Res*. 15 Suppl 2:108–111. doi:10.1186/2047-783x-15-s2-108.
- Ping Z, Wang Z, Shi J, Wang L, Guo X, Zhou W, Hu X, Wu X, Liu Y, Zhang W, et al. 2017. Inhibitory effects of melatonin on titanium particle-induced inflammatory bone resorption and osteoclastogenesis via suppression of NF-κB signaling. *Acta Biomaterialia*. 62:362–371. doi:10.1016/j.actbio.2017.08.046.
- Proença de Oliveira-Maul J, Barbosa de Carvalho H, Goto DM, Maia RM, Fló C, Barnabé V, Franco DR, Benabou S, Perracini MR, Jacob-Filho W, et al. 2013. Aging, Diabetes, and Hypertension Are Associated With Decreased Nasal Mucociliary Clearance. *Chest*. 143(4):1091–1097. doi:10.1378/chest.12-1183.
- Raghu G, Chen S-Y, Yeh W-S, Maroni B, Li Q, Lee Y-C, Collard HR. 2014. Idiopathic pulmonary fibrosis in US Medicare beneficiaries aged 65 years and older: incidence, prevalence, and survival, 2001-11. *Lancet Respir Med*. 2(7):566–572. doi:10.1016/S2213-2600(14)70101-8.
- Rancan L, Paredes S, García C, González P, Rodríguez-Bobada C, Calvo-Soto M, Hyacinthe B, Vara E, Tresguerres J. 2018. Comparison of the Effect of Melatonin Treatment before and after Brain Ischemic Injury in the Inflammatory and Apoptotic Response in Aged Rats. *IJMS*. 19(7):2097. doi:10.3390/ijms19072097.

- Rancán L, Paredes SD, García I, Muñoz P, García C, López de Hontanar G, de la Fuente M, Vara E, Tresguerres JAF. 2017. Protective effect of xanthohumol against age-related brain damage. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 49:133–140. doi:10.1016/j.jnutbio.2017.07.011.
- Rao S, Mondragón L, Pranjić B, Hanada T, Stoll G, Köcher T, Zhang P, Jais A, Lercher A, Berghthaler A, et al. 2019. AIF-regulated oxidative phosphorylation supports lung cancer development. *Cell Res*. 29(7):579–591. doi:10.1038/s41422-019-0181-4.
- Rebello CM, Jobe AH, Eisele JW, Ikegami M. 1996. Alveolar and tissue surfactant pool sizes in humans. *Am J Respir Crit Care Med*. 154(3):625–628. doi:10.1164/ajrccm.154.3.8810596.
- Reiter RJ, Tan D-X, Fuentes-Broto L. 2010. Melatonin: A Multitasking Molecule. In: *Progress in Brain Research*. Vol. 181. Elsevier. p. 127–151. [accessed 2020 Jul 29]. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079612308810084>.
- Ren X, Du H, Li Y, Yao X, Huang J, Li Z, Wang W, Li J, Han S, Wang C, et al. 2014. Age-related activation of MKK/p38/NF- κ B signaling pathway in lung: from mouse to human. *Exp Gerontol*. 57:29–40. doi:10.1016/j.exger.2014.04.017.
- Rocca WA, Gazzuola-Rocca L, Smith CY, Grossardt BR, Faubion SS, Shuster LT, Kirkland JL, Stewart EA, Miller VM. 2016. Accelerated Accumulation of Multimorbidity After Bilateral Oophorectomy: A Population-Based Cohort Study. *Mayo Clinic Proceedings*. 91(11):1577–1589. doi:10.1016/j.mayocp.2016.08.002.
- Rodríguez MI, Carretero M, Escames G, López LC, Maldonado MD, Tan D-X, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D. 2007. Chronic melatonin treatment prevents age-dependent cardiac mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice. *Free Radical Research*. 41(1):15–24. doi:10.1080/10715760600936359.
- Rodríguez-Rubio M, Figueira JC, Acuña-Castroviejo D, Borobia AM, Escames G, de la Oliva P. 2020. A phase II, single-center, double-blind, randomized placebo-controlled trial to explore the efficacy and safety of intravenous melatonin in patients with COVID-19 admitted to the intensive care unit (MelCOVID study): a structured summary of a study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 21(1):699. doi:10.1186/s13063-020-04632-4.
- Rossmann I. 1986. Normal Human Aging: The Baltimore Longitudinal Study of Aging. *JAMA*. 255(7):960. doi:10.1001/jama.1986.03370070114046.
- Ruan L, Zhang X, Li R. 2018. Recent insights into the cellular and molecular determinants of aging. *J Cell Sci*. 131(3):jcs210831. doi:10.1242/jcs.210831.
- Ruppert C, Pucker C, Markart P, Schmidt R, Grimminger F, Seeger W, Stürzebecher J, Günther A. 2003. Selective Inhibition of Large-to-Small Surfactant Aggregate Conversion by Serine Protease Inhibitors of the bis-Benzamidine Type. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 28(1):95–102. doi:10.1165/rcmb.4591.
- Sato I, Morita I, Kaji K, Ikeda M, Nagao M, Murota S. 1993. Reduction of Nitric Oxide Producing Activity Associated with in Vitro Aging in Cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cell. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 195(2):1070–1076. doi:10.1006/bbrc.1993.2153.

- Savinova OV, Hoffmann A, Ghosh G. 2009. The Nfkb1 and Nfkb2 Proteins p105 and p100 Function as the Core of High-Molecular-Weight Heterogeneous Complexes. *Molecular Cell*. 34(5):591–602. doi:10.1016/j.molcel.2009.04.033.
- Schabath MB, Hernandez LM, Wu X, Pillow PC, Spitz MR. 2005. Dietary phytoestrogens and lung cancer risk. *JAMA*. 294(12):1493–1504. doi:10.1001/jama.294.12.1493.
- Şener G, Toklu H, Kapucu C, Ercan F, Erkanlı G, Kaçmaz A, Tilki M, Yeğen BÇ. 2004. Melatonin Protects Against Oxidative Organ Injury in a Rat Model of Sepsis. *Surg Today*. 35(1):52–59. doi:10.1007/s00595-004-2879-1.
- Seow A, Poh W-T, Teh M, Eng P, Wang Y-T, Tan W-C, Chia K-S, Yu MC, Lee H-P. 2002. Diet, reproductive factors and lung cancer risk among Chinese women in Singapore: evidence for a protective effect of soy in nonsmokers. *Int J Cancer*. 97(3):365–371.
- Setchell KDR. 2017. The history and basic science development of soy isoflavones: Menopause. 24(12):1338–1350. doi:10.1097/GME.0000000000001018.
- Sharma G, Hanania NA, Shim YM. 2009. The Aging Immune System and Its Relationship to the Development of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 6(7):573–580. doi:10.1513/pats.200904-022RM.
- Shimazu T, Inoue M, Sasazuki S, Iwasaki M, Sawada N, Yamaji T, Tsugane S, JPHC Study Group. 2011. Plasma isoflavones and the risk of lung cancer in women: a nested case-control study in Japan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 20(3):419–427. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-1025.
- Sicard D, Haak AJ, Choi KM, Craig AR, Fredenburgh LE, Tschumperlin DJ. 2018. Aging and anatomical variations in lung tissue stiffness. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 314(6):L946–L955. doi:10.1152/ajplung.00415.2017.
- Signorelli SS, Neri S, Sciacchitano S, Pino LD, Costa MP, Marchese G, Celotta G, Cassibba N, Pennisi G, Caschetto S. 2006. Behaviour of some indicators of oxidative stress in postmenopausal and fertile women. *Maturitas*. 53(1):77–82. doi:10.1016/j.maturitas.2005.03.001.
- Skillrud DM, Martin WJ. 1984. The isolation of rat alveolar type II cells: a simplified approach using Percoll density centrifugation. *Lung*. 162(4):245–252.
- Skloot GS. 2017. The Effects of Aging on Lung Structure and Function. *Clinics in Geriatric Medicine*. 33(4):447–457. doi:10.1016/j.cger.2017.06.001.
- Smith LJ, Holbrook JT, Wise R, Blumenthal M, Dozor AJ, Mastronarde J, Williams L, American Lung Association Asthma Clinical Research Centers. 2004. Dietary intake of soy genistein is associated with lung function in patients with asthma. *J Asthma*. 41(8):833–843.
- Starkov AA. 2008. The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Metabolism and Signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1147(1):37–52. doi:10.1196/annals.1427.015.
- Starr ME, Ueda J, Yamamoto S, Evers BM, Saito H. 2011. The effects of aging on pulmonary oxidative damage, protein nitration, and extracellular superoxide dismutase down-regulation during systemic inflammation. *Free Radical Biology and Medicine*. 50(2):371–380. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.11.013.

- Statistics Sweden. 2020. Life expectancy 1751–2019. [accessed 2020 Jun 22]. <https://www.scb.se/en/finding-statistics/statistics-by-subject-area/population/population-composition/population-statistics/pong/tables-and-graphs/yearly-statistics--the-whole-country/life-expectancy/>.
- Stevens JF, Miranda CL, Frei B, Buhler DR. 2003. Inhibition of Peroxynitrite-Mediated LDL Oxidation by Prenylated Flavonoids: The α,β -Unsaturated Keto Functionality of 2'-Hydroxychalcones as a Novel Antioxidant Pharmacophore. *Chem Res Toxicol*. 16(10):1277–1286. doi:10.1021/tx020100d.
- Strathmann J, Gerhauser C. 2012. Anti-proliferative and Apoptosis-Inducing Properties of Xanthohumol, a Prenylated Chalcone from Hops (*Humulus lupulus* L.). In: Diederich M, Noworyta K, editors. *Natural compounds as inducers of cell death*. Dordrecht: Springer Netherlands. p. 69–93. [accessed 2017 Nov 23]. http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-94-007-4575-9_4.
- Strathmann J, Klimo K, Sauer SW, Okun JG, Prehn JHM, Gerhäuser C. 2010. Xanthohumol-induced transient superoxide anion radical formation triggers cancer cells into apoptosis *via* a mitochondria-mediated mechanism. *FASEB j*. 24(8):2938–2950. doi:10.1096/fj.10-155846.
- Subramanian J, Govindan R. 2007. Lung cancer in never smokers: a review. *J Clin Oncol*. 25(5):561–570. doi:10.1200/JCO.2006.06.8015.
- Suh Y, Lee K-A, Kim W-H, Han B-G, Vijg J, Park SC. 2002. Aging alters the apoptotic response to genotoxic stress. *Nat Med*. 8(1):3–4. doi:10.1038/nm0102-3.
- Sunil VR, Connor AJ, Guo Y, Laskin JD, Laskin DL. 2002. Activation of type II alveolar epithelial cells during acute endotoxemia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 282(4):L872–880. doi:10.1152/ajplung.00217.2001.
- Svartengren M. 2005. Long-term clearance from small airways decreases with age. *European Respiratory Journal*. 26(4):609–615. doi:10.1183/09031936.05.00002105.
- Taioli E, Wynder EL. 1994. Re: Endocrine factors and adenocarcinoma of the lung in women. *J Natl Cancer Inst*. 86(11):869–870.
- Takeda T. 1999. Senescence-accelerated mouse (SAM): a biogerontological resource in aging research. *Neurobiol Aging*. 20(2):105–110.
- Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, Irino M, Higuchi K, Matsushita T, Tomita Y, Yasuhira K, Hamamoto H, Shimizu K, et al. 1981. A new murine model of accelerated senescence. *Mech Ageing Dev*. 17(2):183–194.
- Takhtfooladi H, Takhtfooladi M, Moayer F, Mobarakeh S. 2015. Melatonin attenuates lung injury in a hind limb ischemia–reperfusion rat model. *Revista Portuguesa de Pneumologia (English Edition)*. 21(1):30–35. doi:10.1016/j.rppnen.2014.01.010.
- Tan D, Reiter R, Manchester L, Yan M, El-Sawi M, Sainz R, Mayo J, Kohen R, Allegra M, Hardelan R. 2002. Chemical and Physical Properties and Potential Mechanisms: Melatonin as a Broad Spectrum Antioxidant and Free Radical Scavenger. *CTMC*. 2(2):181–197. doi:10.2174/1568026023394443.

- Tan D-X, Hardeland R, Manchester LC, Paredes SD, Korkmaz A, Sainz RM, Mayo JC, Fuentes-Broto L, Reiter RJ. 2010. The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 85(3):607–623. doi:10.1111/j.1469-185X.2009.00118.x.
- Taylor BS, de Vera ME, Ganster RW, Wang Q, Shapiro RA, Morris SM, Billiar TR, Geller DA. 1998. Multiple NF- κ B Enhancer Elements Regulate Cytokine Induction of the Human Inducible Nitric Oxide Synthase Gene. *J Biol Chem.* 273(24):15148–15156. doi:10.1074/jbc.273.24.15148.
- Tha KK, Okuma Y, Miyazaki H, Murayama T, Uehara T, Hatakeyama R, Hayashi Y, Nomura Y. 2000. Changes in expressions of proinflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α and IL-6 in the brain of senescence accelerated mouse (SAM) P8. *Brain Research.* 885(1):25–31. doi:10.1016/S0006-8993(00)02883-3.
- Townsend EA, Miller VM, Prakash YS. 2012. Sex differences and sex steroids in lung health and disease. *Endocr Rev.* 33(1):1–47. doi:10.1210/er.2010-0031.
- Troen BR. 2003. The biology of aging. *Mt Sinai J Med.* 70(1):3–22.
- Ueda T, Cheng G, Kuroki Y, Sano H, Sugiyama K, Motojima S, Fukuda T. 2000. Effects of aging on surfactant forms in rats. *Eur Respir J.* 15(1):80–84. doi:10.1183/09031936.00.15108000.
- Vahsen N, Candé C, Brière J-J, Bénit P, Joza N, Larochette N, Mastroberardino PG, Pequignot MO, Casares N, Lazar V, et al. 2004. AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J.* 23(23):4679–4689. doi:10.1038/sj.emboj.7600461.
- Valsecchi AE, Franchi S, Panerai AE, Rossi A, Sacerdote P, Colleoni M. 2011. The soy isoflavone genistein reverses oxidative and inflammatory state, neuropathic pain, neurotrophic and vasculature deficits in diabetes mouse model. *Eur J Pharmacol.* 650(2–3):694–702. doi:10.1016/j.ejphar.2010.10.060.
- Vara E, Arias-Díaz J, García C, Hernández J, Balibrea JL. 1995. Both prostaglandin E2 and nitric oxide sequentially mediate the tumor necrosis factor alpha-induced inhibition of surfactant synthesis by human type II pneumocytes. *Arch Surg.* 130(12):1279–1285; discussion 1286. doi:10.1001/archsurg.1995.01430120033005.
- Vara E, Tamarit-Rodriguez J. 1989. Norepinephrine inhibits islet lipid metabolism, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake, and insulin secretion. *Am J Physiol.* 257(6 Pt 1):E923–929. doi:10.1152/ajpendo.1989.257.6.E923.
- Vegeto E, Cuzzocrea S, Crisafulli C, Mazzon E, Sala A, Krust A, Maggi A. 2010. Estrogen receptor-alpha as a drug target candidate for preventing lung inflammation. *Endocrinology.* 151(1):174–184. doi:10.1210/en.2009-0876.
- Veldhuizen RA, Marcou J, Yao LJ, McCaig L, Ito Y, Lewis JF. 1996. Alveolar surfactant aggregate conversion in ventilated normal and injured rabbits. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.* 270(1):L152–L158. doi:10.1152/ajplung.1996.270.1.L152.
- Veldhuizen RAW, McCaig LA, Pape C, Gill SE. 2019. The effects of aging and exercise on lung mechanics, surfactant and alveolar macrophages. *Exp Lung Res.* 45(5–6):113–122. doi:10.1080/01902148.2019.1605633.

- Vistoli G, De Maddis D, Cipak A, Zarkovic N, Carini M, Aldini G. 2013. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radical Research*. 47(sup1):3–27. doi:10.3109/10715762.2013.815348.
- Walski M, Pokorski M, Antosiewicz J, Rekawek A, Frontczak-Baniewicz M, Jernajczyk U, Di Giulio C. 2009. Pulmonary surfactant: ultrastructural features and putative mechanisms of aging. *J Physiol Pharmacol*. 60 Suppl 5:121–125.
- Wolff DG. 1976. The formation of carbon monoxide during peroxidation of microsomal lipids. *Biochem Biophys Res Commun*. 73(4):850–857. doi:10.1016/0006-291x(76)90199-6.
- Yu BP, Masoro EJ, Murata I, Bertrand HA, Lynd FT. 1982. Life Span Study of SPF Fischer 344 Male Rats Fed AdLibitum or Restricted Diets: Longevity, Growth, Lean Body Mass and Disease. *Journal of Gerontology*. 37(2):130–141. doi:10.1093/geronj/37.2.130.
- Yu W, Bonnet M, Farso M, Ma K, Chabot J-G, Martin E, Torriglia A, Guan Z, McLaurin J, Quirion R, et al. 2014. The expression of apoptosis inducing factor (AIF) is associated with aging-related cell death in the cortex but not in the hippocampus in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. *BMC Neurosci*. 15(1):73. doi:10.1186/1471-2202-15-73.
- Zafar A, Singh S, Naseem I. 2016. Cu(II)-coumestrol interaction leads to ROS-mediated DNA damage and cell death: a putative mechanism for anticancer activity. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 33:15–27. doi:10.1016/j.jnutbio.2016.03.003.
- Zámocký M, Koller F. 1999. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 72(1):19–66. doi:10.1016/S0079-6107(98)00058-3.
- Zaslaver M, Offer S, Kerem Z, Stark AH, Weller JI, Eliraz A, Madar Z. 2005. Natural compounds derived from foods modulate nitric oxide production and oxidative status in epithelial lung cells. *J Agric Food Chem*. 53(26):9934–9939. doi:10.1021/jf052000u.
- Zhang H, Liu D, Wang X, Chen X, Long Y, Chai W, Zhou X, Rui X, Zhang Q, Wang H, et al. 2013. Melatonin improved rat cardiac mitochondria and survival rate in septic heart injury. *J Pineal Res*. 55(1):1–6. doi:10.1111/jpi.12033.
- Zhao F, Nozawa H, Daikonnya A, Kondo K, Kitanaka S. 2003. Inhibitors of Nitric Oxide Production from Hops (*Humulus lupulus* L.). *Biol Pharm Bull*. 26(1):61–65. doi:10.1248/bpb.26.61.
- Zou C, Butler PL, Coon TA, Smith RM, Hammen G, Zhao Y, Chen BB, Mallampalli RK. 2011. LPS impairs phospholipid synthesis by triggering beta-transducin repeat-containing protein (beta-TrCP)-mediated polyubiquitination and degradation of the surfactant enzyme acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase I (LPCAT1). *J Biol Chem*. 286(4):2719–2727. doi:10.1074/jbc.M110.192377.
- Zscheppang K, Konrad M, Zischka M, Huhn V, Dammann CEL. 2011. Estrogen-induced upregulation of Sftpb requires transcriptional control of neuregulin receptor ErbB4 in mouse lung type II epithelial cells. *Biochim Biophys Acta*. 1813(10):1717–1727. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.06.020.

9. Anexos

Artículo I



Melatonin decreases the expression of inflammation and apoptosis markers in the lung of a senescence-accelerated mice model

Ángela Puig^{a,1}, Lisa Rancan^{a,1}, Sergio D. Paredes^{b,1}, Adrián Carrasco^a, Germaine Escames^c, Elena Vara^a, Jesús A.F. Tresguerres^{b,*}

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology III, School of Medicine, Complutense University of Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

^b Department of Physiology, School of Medicine, Complutense University of Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

^c University of Granada, Institute of Biotechnology, Center of Biomedical Investigation, Edificio Fray Luis de Granada C/ Ramón y Cajal, 4, 18003 Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 June 2015

Received in revised form 30 October 2015

Accepted 30 November 2015

Available online 1 December 2015

Section Editor: Chennai Guest Editor

Keywords:

Aging

Lung

Melatonin

Inflammation

Oxidative stress

Apoptosis

ABSTRACT

Aging is associated with an increase in oxidative stress and inflammation. The aging lung is particularly affected since it is continuously exposed to environmental oxidants while antioxidant machinery weakens with age. Melatonin, a free radical scavenger, counteracts inflammation and apoptosis in healthy cells from several tissues. Its effects on the aging lung are, however, not yet fully understood. This study aimed to investigate the effect of chronic administration of melatonin on the expression of inflammation markers (TNF- α , IL-1 β , NF- κ B2, HO-1) and apoptosis parameters (BAD, BAX, AIF) in the lung tissue of male senescence-accelerated prone mice (SAMP8). In addition, RNA oxidative damage, as the formation of 8-hydroxyguanosine (8-OHG), was also evaluated. Young and old animals, aged 2 and 10 months respectively, were divided into 4 groups: untreated young, untreated old, old mice treated with 1 mg/kg/day melatonin, and old animals treated with 10 mg/kg/day melatonin. Untreated young and old male senescence accelerated resistant mice (SAMR1) were used as controls. After 30 days of treatment, animals were sacrificed. Lungs were collected and immediately frozen in liquid nitrogen. mRNA and protein expressions were measured by RT-PCR and Western blotting, respectively. Levels of 8-OHG were quantified by ELISA. Mean values were analyzed using ANOVA. Old nontreated SAMP8 animals showed increased ($p < 0.05$) mRNA and protein levels of TNF- α , IL-1 β , NF- κ B2, and HO-1 compared to young mice and SAMR1 mice. Melatonin treatment with either dose reversed the aging-derived inflammation ($p < 0.05$). BAD, BAX and AIF expressions also rose with aging, the effect being counteracted with melatonin ($p < 0.05$). Aging also caused a significant elevation ($p < 0.05$) in SAMP8 8-OHG values. This increase was not observed in animals treated with melatonin ($p < 0.05$). In conclusion, melatonin treatment was able to modulate the inflammatory and apoptosis status of the aging lungs, exerting a protective effect on age-induced damage.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Aging is a universal process through which organisms become more vulnerable to disease until they eventually die (Harman, 1981). Aging mechanisms and how to elude them have always fascinated the human being. The first theories that relate this process to oxidative stress were born in the 1950s (Harman, 1956), when the dysfunction of several biomolecules was attributed to the action of free radicals.

Free radicals are highly reactive molecules due to an unpaired electron in their outer orbital, as they tend to combine with other molecules and therefore modify their structure. Free radicals are bound to be formed

in every living being, as a result of ionizing radiation, as well as enzymatic and non-enzymatic reactions necessary for life. The main source of free radicals in mammals is oxidative phosphorylation (Harman, 1972), where reactive oxygen species (ROS) appear because of the incomplete reduction of O₂: some examples are superoxide anion (O₂⁻), hydroxyl radical (OH[•]) or hydrogen peroxide (H₂O₂). These appear in acute inflammation as a protective response against an internal or external insult. However, chronic inflammation leads to continuous oxidative stress and to cell damage and dysfunction, both seen through the aging process (Reuter et al., 2010).

The lung is especially exposed to free radicals because of its direct contact with environmental pollutants, such as tobacco smoke, ozone or even the O₂ content of the air. On top of that, respiratory diseases, widely common, induce an inflammatory response, which increases oxidative stress (Kinnula and Crapo, 2003). Sustained inflammation and oxidative stress are implicated in the pathophysiology of several pulmonary diseases, such as asthma or chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (Angelis et al., 2014). Most organisms have developed

* Corresponding author at: Complutense University of Madrid, School of Medicine, Department of Physiology, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain.

E-mail addresses: angela-puig91@gmail.com (Á. Puig), lisa_rancan@hotmail.com (L. Rancan), sergiodamianparedes@med.ucm.es (S.D. Paredes), adriancamu8@gmail.com (A. Carrasco), gescames@ugr.es (G. Escames), evaraami@ucm.es (E. Vara), guerres@med.es (J.A.F. Tresguerres).


¹ These authors contributed equally to this work.

Artículo II

RESEARCH ARTICLE



Protective effects of 17- β -oestradiol and phytoestrogen on age-induced oxidative stress and inhibition of surfactant synthesis in rat type II pneumocytes

Lisa Rancan^{a*}, Angela Puig^{a*} , José M. Balibrea^b, Sergio D. Paredes^c, Cruz García^a, Luis Jiménez^a, Jesús A. Fernández-Tresguerres^c and Elena Vara^a

^aDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain;

^bDepartment of General Surgery, Vall d'Hebron Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ^cDepartment of Physiology, School of Medicine, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

ABSTRACT

Epidemiological data suggest protective effects of oestrogen and phytoestrogen on lung tissue. This study aimed to elucidate the role of 17- β -oestradiol and phytoestrogen in age-related inhibition of surfactant synthesis and oxidative stress in rat type II pneumocytes. Forty male and 66 female Wistar rats were used. Female rats were randomly kept intact or ovariectomized at age 12 months. At age 22 months, ovariectomized rats received 17- β -oestradiol, soy extract, or no treatment. Oxidative stress markers CO, NO, cGMP and lipid peroxide (LPO), antioxidant enzymes and phosphatidylcholine (PC) were measured in cultured type II pneumocytes isolated at ages 2, 14, 18, 22 and 24 months. Old, male and ovariectomized rats showed significantly higher CO, NO, cGMP and LPO and lower PC content and antioxidant enzymes. 17- β -oestradiol and phytoestrogen significantly reversed these effects. In conclusion, aging and oestrogen deprivation decreased PC synthesis and altered the redox status in type II pneumocytes, which were partially restored by 17- β -oestradiol or soy supplementation.

ARTICLE HISTORY

Received 27 January 2020
Revised 14 April 2020
Accepted 14 April 2020

KEYWORDS



17- β -Oestradiol; phytoestrogen; aging; oxidative stress; surfactant; type II pneumocytes

Introduction

Chronic respiratory conditions are a leading threat to human health and development. Although these conditions have distinct pathophysiologies, epidemiological data suggest that sex-related hormones may contribute to the pathogenesis and/or progression of at least some lung diseases (Badesch et al. 2010; Choi 2011; Leynaert et al. 2012). For instance, idiopathic pulmonary fibrosis has been implicated as a male-predominant disease in terms of prevalence (Townsend et al. 2012). However, the severity of pulmonary fibrosis also appears to depend on sex, in this case, with mortality rates increasing more rapidly in women than in men, with female lungs being more prone to fibrosis in animal models (Moore and Hogaboam 2008; Brass et al. 2010; Raghu et al. 2014). Moreover, asthmatic women experience worsening of symptoms with oestrogen downswing (Townsend et al. 2012). It has been shown that women subjected to double oophorectomy before age 46 years are at increased risk

of developing asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (Rocca et al. 2016). Similarly, female smokers after menopause show a faster decline in lung function and an increased risk of developing COPD than male smokers, with hormone replacement therapy being associated with reduced bronchial hyper-responsiveness in post-menopausal women (Gan et al. 2006).

It has been shown that oestrogen has a pivotal role in many aspects of normal and altered pulmonary physiology (Townsend et al. 2012). Moreover, oestrogens play an important role in foetal lung development, with higher levels of oestrogen receptors found in mouse foetal lung than in early postnatal or adult lungs (Seaborn et al. 2010). Oestrogen status also seems to play a role in the aging process of the lung. Oestrogen-deficient aging female mice have been shown to develop an emphysematous phenotype, with oestradiol supplementation restoring the normal turnover rate of the extracellular matrix (Glassberg et al. 2014).

CONTACT Angela Puig  angela.puig@ucm.es  Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, Complutense University of Madrid, Avda Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

*Both authors contributed equally to this work

© 2020 Taylor & Francis Group, LLC

Congresos

Ángela Puig Ramos; Lisa Rancan; Sergio Damián Paredes Royano; Guillermo Yoldi Salinas; Roman Kireev; Elena Vara Ameigeiras; Jesús Ángel Fernández-Tresguerres Hernández. Melatonin decreases the expression of inflammation and apoptosis markers in the lung of a senescence-accelerated mice model. International Union of Physiological Sciences. Birmingham, julio de 2013.

Poster Communications

PCA001

Xanthohumol reduces transcription of pro-inflammatory markers TNF- α , IL-1 β , NF κ B2, and HO1 in the lung of senescence-accelerated prone mice (SAMP8)

S. Paredes¹, A. Carrasco², L. Rancan², R. Kireev¹, E. Vara² and J. F. Tresguerres¹

¹Department of Physiology, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain and ²Department of Biochemistry and Molecular Biology III, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

Lungs are highly vascularised organs directly exposed to atmospheric oxygen. Consequently, they are an important source of reactive species that seem to be involved in local defense against pathogens. With age, increased production of free radicals, together with a reduced antioxidant defense activity, may surpass the antioxidative capability of lungs, leading to lung damage and increasing susceptibility to other pathologies. Xanthohumol, the major prenylated chalcone found in hops, has been shown to present anti-inflammatory and antioxidant properties in several organs, including liver, brain, and at the level of the reproductive system. Its effect on the aging lung has yet to be elucidated. For this reason, the aim of the present study was to evaluate the possible anti-inflammatory role of xanthohumol on a model of male senescence-accelerated prone mice (SAMP8). Young and old animals, aged 2 and 10 months respectively, were maintained under a 12:12 h light-dark cycle in an environmentally-controlled room and fed ad libitum. They were divided into 4 experimental groups: Young non-treated, old non-treated, old treated with 1 mg/kg/day xanthohumol, and old treated with 5 mg/kg/day xanthohumol. Young and old non-treated male senescence-accelerated resistant mice (SAMR1) were used as controls. Xanthohumol was dissolved in ethanol and added to the drinking water. Only ethanol was administered to the water of non-treated animals. After 30 days of treatment, animals were sacrificed and lungs were collected and immediately frozen in liquid nitrogen. mRNA expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 beta (IL-1 β), nuclear factor NF- κ B p100 subunit (NF κ B2), and heme oxygenase 1 (HO1) was measured by means of RT-PCR using the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK) and 300 nM concentrations of specific primers. For the normalization of cDNA loading in the PCR reaction, the amplification of 18S rRNA for every sample was used. Relative changes in gene expression were calculated using the 2- $\Delta\Delta$ Ct method. Mean values were analyzed by ANOVA. Compared to the young animals, old non-treated SAMP8 mice presented significantly elevated ($P<0.05$) mRNA levels of TNF- α , IL-1 β , NF κ B2, and HO1. SAMR1 mice showed significantly decreased ($P<0.05$) mRNA levels of these pro-inflammatory markers in comparison with the old non-treated SAMP8 group. Treatment with xanthohumol was able to decrease significantly ($P<0.05$) the age-induced elevation at any of the doses administered. Supplementing the diet with foodstuffs containing xanthohumol may be used as a potential tool for counteracting inflammation and oxidative stress in the aging lung.

Where applicable, the authors confirm that the experiments described here conform with The Physiological Society ethical requirements.

PCA002

Melatonin decreases the expression of inflammation and apoptosis markers in the lung of a senescence-accelerated mice model

A. Puig¹, L. Rancan¹, S. Paredes², G. Yoldi², R. Kireev², E. Vara¹ and J. F. Tresguerres²

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology III, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain and ²Department of Physiology, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

Aging is associated with an increase in oxidative stress and inflammation. Aging lung is particularly affected to this damage since alveolar epithelial cells are continuously exposed to environmental oxidants and antioxidant machinery seems to be weakened with age. Melatonin is a potent free radical scavenger and broad spectrum antioxidant that has been shown to counteract inflammation and apoptosis in healthy cells. Its effect on aging lung is, however, not yet fully understood. Thus, the aim of the present study was to investigate the effect of the exogenous administration of melatonin on the mRNA expression of inflammation markers tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 beta (IL-1 β), nuclear factor NF- κ B p100 subunit (NF κ B2), heme oxygenase 1 (HO1) and apoptosis parameters Bcl-2-associated death promoter (BAD) and apoptosis inducing factor (AIF) in male senescence-accelerated prone mice (SAMP8). Young and old animals, aged 2 and 10 months respectively, were maintained under a 12:12 h light-dark cycle in an environmentally-controlled room and fed ad libitum. They were divided into 4 experimental groups: Young non-treated, old non-treated, old treated with 1 mg/kg/day melatonin, and old treated with 10 mg/kg/day melatonin. Young and old non-treated male senescence-accelerated resistant mice (SAMR1) were used as controls. Melatonin was dissolved in ethanol and added to the drinking water. Only ethanol was administered to the water of non-treated animals. After 30 days of treatment, animals were sacrificed and lungs were collected and immediately frozen in liquid nitrogen. mRNA expression was measured by means of RT-PCR using the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK) and 300 nM concentrations of specific primers. For the normalization of cDNA loading in the PCR reaction, the amplification of 18S rRNA for every sample was used. Relative changes in gene expression were calculated using the 2- $\Delta\Delta$ Ct method. Mean values were analyzed by ANOVA. Old non-treated SAMP8 animals showed significantly increased ($P<0.05$) levels of TNF- α , IL-1 β , NF κ B2, and HO1 with respect to the values obtained in the young group. SAMR1 mice showed significantly decreased ($P<0.05$) mRNA levels of these pro-inflammatory markers in comparison with the old non-treated SAMP8 group. Melatonin treatment with either dose tested was able to reverse significantly ($P<0.05$) the aging-derived augmentation of these inflammatory markers. In addition, BAD and AIF expression rose with aging, the effect being significantly counteracted ($P<0.05$) with melatonin administration. Melatonin treatment may modulate the inflammatory and apoptosis status of the aging lung, exerting a protective effect on age-induced damage.

Where applicable, the authors confirm that the experiments described here conform with The Physiological Society ethical requirements.

Alberto González; **Ángela Puig Ramos**; Pedro Muñoz Gómez; Lisa Rancan; Sergio Damián Paredes Royano; Jesús Ángel Fernández-Tresguerres Hernández; Elena Vara Ameigeiras. El tratamiento con melatonina disminuye la expresión de los marcadores inflamatorios TNF- α , IL-1 β , NFkB2 y HO1 y apoptóticos BAD y AIF en el pulmón senescente de ratones SAMP8. IX Congreso Internacional de Alimentación, Nutrición y Dietética. Madrid, mayo de 2014.

cedentes de Argentina, Cuba, México, Venezuela y España. En dicho documento se pretende ofrecer tanto la distribución percentil como su asociación con la estatura, aspecto fundamental para efectuar la corrección necesaria frente al tamaño corporal, tan importante en sujetos que se hallan en proceso de crecimiento. Aportamos aquí, únicamente los valores promedio y desvíos estándar por categoría de edad y sexo.

EL RAMADÁN EN LA EMBARAZADA DIABÉTICA

Jiménez González, M. O.; Hernández Llorente, E.; Sánchez Guisado, M. M.

INTRODUCCIÓN

El Ramadán o ayuno diario para las mujeres embarazadas con diabetes sigue siendo un tema polémico y no denunciado. Muchas mujeres musulmanas realizan ayuno durante el embarazo por motivos religiosos dejando en un segundo plano el bienestar materno-fetal. A pesar de que el Corán exime a las embarazadas de ayuno, muchas gestantes diabéticas lo continúan realizando.

OBJETIVOS

Es esencial para la enfermería, para los médicos de familia y las matronas (por su accesibilidad a los pacientes y la familia), modificar esta actitud y hacerlos conscientes de que este hábito tiene implicaciones potencialmente peligrosas para la salud materno-fetal. Nuestro objetivo principal es dar a conocer al personal sanitario los riesgos que conlleva realizar el ayuno de Ramadán si la gestante sufre diabetes durante su embarazo.

METODOLOGÍA

Revisión bibliográfica a través de una búsqueda exhaustiva en Medline, Pubmed, Cochrane, Uptodate, OMS, Sociedad Española de Obstetricia y Ginecología, Asociación Española de Pediatría, Sociedad Española de Diabetes, entre los años 2000 y 2013.

RESULTADOS

Los recién nacidos expuestos al ayuno del Ramadán tienen un estado de salud general más pobres que otros. Hacer ayuno si se tiene diabetes en el embarazo es una de las causas más frecuentes de muerte fetal. El Ramadán no conduce a cetonemia materna o cetonuria en mujeres embarazadas no diabéticas y no tiene ningún efecto adverso significativo sobre el desarrollo fetal intrauterino o la salud del feto, en embarazos de bajo riesgo.

El uso de Insulina NPH diaria es una opción segura y tolerable para las embarazadas diabéticas que desean ayunar durante el Ramadán, pero es necesario realizar ajustes de insulina y agentes hipoglucemiantes.

DISCUSIÓN

Los cambios importantes en los hábitos alimenticios, actividades físicas diarias y los patrones de sueño durante el Ramadán tienen impacto significativo en el control de la glucemia, perfil lipídico, el peso y la ingesta dietética.

Se recomienda que la paciente se realice una evaluación previa para valorar su riesgo por el ayuno y realizar una educación pre-ramadán. Si es necesario, la mujer será derivada a un en-

docrino para mantener los niveles de glucemia en sus límites normales.

EL TRATAMIENTO CON MELATONINA DISMINUYE LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES INFLAMATORIOS TNF- α , IL-1 β , NFkB2 Y HO1 Y APOPTÓTICOS BAD Y AIF EN EL PULMÓN SENESCENTE DE RATONES SAMP8

González, A.¹; Puig, Á.¹; Muñoz, P.¹; Rancan, L.¹; Paredes, S. D.²; Tresguerres, J. A. F.²; Vara, E.¹

¹ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid (España). ² Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid (España).

El envejecimiento se asocia con un incremento de estrés oxidativo e inflamación. El pulmón senescente se ve especialmente afectado ya que las células epiteliales alveolares están continuamente expuestas a los oxidantes del medio ambiente y la maquinaria antioxidante parece debilitarse con la edad. La melatonina es un potente secuestrador de radicales libres y antioxidante de amplio espectro que se ha mostrado como molécula eficaz para contrarrestar la inflamación y la apoptosis en células sanas y cuya presencia en alimentos y bebidas de origen vegetal está ampliamente demostrada. Sin embargo, su efecto sobre el envejecimiento pulmonar no se encuentra totalmente esclarecido. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue investigar el efecto de la administración exógena de melatonina sobre la expresión de ARNm de los marcadores de inflamación TNF- α , IL-1 β , NFkB2 y HO1 y los parámetros de apoptosis BAD y AIF en ratones machos con senescencia acelerada (SAMP8). Para ello se utilizaron ratones jóvenes y viejos, de 2 y 10 meses de edad respectivamente, a los que se mantuvo en condiciones ambientales controladas, con fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, y acceso a comida y bebida ad libitum. Los animales se dividieron en 4 grupos experimentales: Jóvenes no tratados, viejos no tratados, y viejos tratados con 1 mg/kg/día o bien con 10 mg/kg/día de melatonina, disuelta en etanol en el agua de bebida. Como controles se utilizaron ratones con senescencia retardada (SAMR1) a los que se sometió a las mismas condiciones de estabulación y tratamiento que a sus correspondientes grupos SAMP8, con la diferencia de que al agua de bebida se añadió solamente etanol. El tratamiento tuvo una duración de 30 días tras los cuales se procedió al sacrificio de los animales y la extracción de los pulmones, que fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido. Los niveles de ARNm de los marcadores inflamatorios y apoptóticos se cuantificaron mediante RT-PCR, utilizando el método de fluorescencia SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) y una concentración 300 nM de cebadores específicos. Se utilizó el gen endógeno 18S como control interno. Los cambios en la expresión del ARNm se analizaron siguiendo el método de 2- $\Delta\Delta Ct$ y las medias mediante ANOVA. Los animales SAMP8 viejos no tratados mostraron un aumento significativo ($P < 0,05$) de los niveles de TNF- α , IL-1 β , NFkB2 y HO1 con respecto a los valores obtenidos en el grupo de jóvenes. Los ratones SAMR1 exhibieron niveles significativamente menores ($P < 0,05$) de estos marcadores pro-inflamatorios en comparación con el grupo SAMP8 de animales viejos no tratados. El tra-

